



Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

# Regulación de la actividad de la GTPasa RRas2 por interacción directa con los receptores de antígeno

**Enrique Calleja Sierra**

Madrid  
2017

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>4</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>8</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>10</b>
<b>MOTIVACIÓN DEL TRABAJO</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
<b>1. MATERIALES</b>	<b>16</b>
1.1 LÍNEAS CELULARES:	16
1.2 CÉLULAS PRIMARIAS	16
1.3 REACTIVOS	16
<b>2. MÉTODOS</b>	<b>26</b>
2.1 OBTENCIÓN DE CÉLULAS PRIMARIAS	26
2.1.1 OBTENCIÓN DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA	26
2.2 TRANSFECCIÓN/NUCLEOFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES	27
2.3 NUCLEOFECCIÓN DE PBLs HUMANOS	27
2.4 ENSAYOS DE PULL-DOWN E INMUNOPRECIPITACIÓN	27
2.4.1 PULL-DOWN CON GST-RAF1-RBD /GST-P110δ-RBD EN LISADOS CELULARES	27
2.4.2 PULL-DOWN CON PÉPTIDOS BIOTINILADOS EN LISADOS CELULARES	28
2.4.3 PULL-DOWN CON PÉPTIDOS BIOTINILADOS <i>IN-VITRO</i>	28
2.4.4 INMUNOPRECIPITACIÓN EN LÍNEAS CELULARES	28
2.4.5 FAR-WESTERN BLOT	29
2.5 CITOMETRÍA	29
2.5.1 FRET EN CÉLULAS VIVAS	29
2.5.2 MEDICIÓN DE PAKT S473 Y PPÈRK EN CÉLULAS FIJADAS.	30
2.6 MEDIDAS DE AFINIDAD RRAS2-CD3ζ (BIACORE)	30
2.7 RMN DEL ITAM ζA	31
2.8 ENSAYOS DE INTERCAMBIO DE NUCLEÓTIDOS	31
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>32</b>
<b>1. BIOLOGÍA DE RAS</b>	<b>32</b>
1.1 SUPERFAMILIA RAS DE GTPASAS DE BAJO PESO MOLECULAR	32
1.2 RAS, PRIMER MIEMBRO DE LA FAMILIA	33
1.3 CONSERVACIÓN DE SECUENCIA EN LAS ISOFORMAS RAS	34

<b>1.4</b>	<b>REGULACIÓN MEDIANTE GEFs Y GAPs</b>	<b>35</b>
1.4.1	PROTEÍNAS GEF EXPRESADAS EN LINFOCITOS	36
1.4.2	SINERGIA ENTRE SOS1 Y RASGRP1	39
<b>1.5</b>	<b>TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADA POR RAS</b>	<b>40</b>
<b>2.</b>	<b>MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE RAS</b>	<b>44</b>
2.1	SÍNTESIS, PROCESAMIENTO Y TRÁFICO A LA MEMBRANA PLASMÁTICA	44
2.2	CICLO DE ASOCIACIÓN-DISOCIACIÓN DE RAS EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA	47
2.3	MODIFICACIONES NO LIPÍDICAS	48
2.4	NANOCLUSTERS Y DIMERIZACIÓN	50
<b>3.</b>	<b>PAPEL DE RAS EN EL SISTEMA INMUNE</b>	<b>52</b>
<b>4.</b>	<b>RECEPTORES PARA ANTÍGENO</b>	<b>53</b>
4.1	ORGANIZACIÓN DEL TCR Y BCR EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA	54
4.2	ITAMS: UNIDADES DE SEÑALIZACIÓN	55
<b>5.</b>	<b>FAMILIA DE GTPASAS RRAS</b>	<b>56</b>
	<b>RESULTADOS</b>	<b>60</b>
<b>1.</b>	<b>RRAS2 SE ASOCIA DE MANERA DIRECTA A SECUENCIAS ITAM</b>	<b>61</b>
<b>2.</b>	<b>LA ASOCIACIÓN A LOS ITAMS ES DEPENDIENTE DE LAS TIROSINAS Y LEUCINAS CONSERVADAS</b>	<b>64</b>
<b>3.</b>	<b>LA CONFORMACIÓN ESPACIAL DE <math>\zeta</math>A WT INFLUYE EN LA AFINIDAD</b>	<b>67</b>
<b>4.</b>	<b>LA SECUENCIA DE POLI-PROLINA DE RRAS2 ES FUNDAMENTAL PARA LA INTERACCIÓN</b>	<b>69</b>
<b>5.</b>	<b>MUTACIONES EN LA SECUENCIA DE POLI-PROLINA REDUCEN LA ACTIVIDAD DE RRAS2</b>	<b>72</b>
<b>6.</b>	<b>LA EXPRESIÓN DEL TCR EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA ACTIVA A RRAS2</b>	<b>76</b>
<b>7.</b>	<b>RRAS2 ES UN MEJOR ACTIVADOR DE LA RUTA DE PI3K QUE KRAS, PERO PEOR DE LA RUTA DE RAF→ERK</b>	<b>79</b>
<b>8.</b>	<b>RRAS2 PRESENTA UN ESTADO BASAL DE ACTIVACIÓN MÁS ALTO QUE LAS RAS CLÁSICAS</b>	<b>81</b>
<b>9.</b>	<b>MUTACIONES EN EL LOOP <math>\beta</math>2-<math>\beta</math>3 DE RRAS2, TAMBIÉN RESULTAN EN UNA DISMINUCIÓN DE SU ACTIVIDAD</b>	<b>83</b>
<b>10.</b>	<b>EL ITAM <math>\zeta</math>A ACTIVA <i>IN-VITRO</i> A RRAS2 Y PROMUEVE LA APERTURA DEL BOLSILLO DE NUCLEÓTIDO.</b>	<b>86</b>
	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>89</b>

<b>1. RRAS2 INTERACCIONA Y ES ACTIVADO POR EL ITAM <math>\zeta</math>A</b>	<b>89</b>
<b>2. RRAS2 Y EL ITAM <math>\zeta</math>A SE ASOCIAN CON UNA ALTA AFINIDAD</b>	<b>93</b>
<b>3. RRAS2 PARTICIPA ACTIVAMENTE EN LA RUTA DE PI3K→AKT, PERO EN MENOR MEDIDA EN LA DE RAF→ERK.</b>	<b>95</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>99</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO I: LISTA DE OLIGOS</b>	<b>133</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: FRET por citometría de flujo.....	29
Figura 2: La superfamilia Ras de GTPasas pequeñas2 .....	32
Figura 3: Ciclo de las GTPasas .....	33
Figura 4: Comparativa de secuencias de Ras y sus dominios estructurales.....	34
Figura 5: Organización estructural de los dominios de las tres familias de GEFs expresadas en linfocitos .....	36
Figura 6: Modelos de activación de Ras en células T.....	38
Figura 7: Modelo de sinergia entre RasGRP y SOS .....	40
Figura 8: Representación simplificada de las principales vías de señalización de Ras.....	41
Figura 9: Modificaciones post-traduccionales de Ras.....	44
Figura 10: Procesamiento y tráfico intracelulares de Ras .....	46
Figura 11: Modificaciones condicionales de Ras.....	48
Figura 12: Organización y estructura de los receptores para antígeno.....	53
Figura 13: Comparativa de secuencia entre las Ras clásicas y la familia Rras.....	57
Figura 14: RRas2 interacciona con secuencias ITAMs .....	61



Figura 15: Afinidad entre RRas2 y $\zeta$ a WT .....	63
Figura 16: RRas2 se asocia con distinta afinidad dependiendo del ITAM .....	64
Figura 17: Las tirosinas del ITAM son imprescindibles para la asociación.....	65
Figura 18: Las leucinas del ITAM también son esenciales en la interacción .....	66
Figura 19: RRas2 interacciona preferentemente con la secuencia más estructurada de $\zeta$ a WT .....	67
Figura 20: Residuos no conservados en todos los ITAM tienen importancia en la interacción.....	68
Figura 21: Residuos del HVR de RRas2 implicados en la interacción con $\zeta$ a WT.....	69
Figura 22: Los mutantes P187A y P189A también muestran menos afinidad hacia Ig $\alpha$ . 70	
Figura 23: Mutantes de prolina de Rras2 provocan una disminución de su actividad .....	72
Figura 24: La interacción de los mutantes de prolina con el RBD de P110 $\delta$ es menor.....	73
Figura 25: El intercambio intrínseco de nucleótidos está impedido en los mutantes P187A y P189A .....	74
Figura 26: Mutaciones en la serina 186 de RRas2 no afectan a su actividad. ....	75
Figura 27: La presencia del TCR en la membrana plasmática hace a Rras2 más activo... 76	
Figura 28: RRas2 es activado por la cadena CD3 $\zeta$ del TCR .....	77
Figura 29: CD3 $\zeta$ activa a RRas2 sin necesidad de fosforilación .....	78
Figura 30: RRas2 es un mejor activador de la ruta de PI3K que KRas .....	79
Figura 31: RRas2 no actúa sobre la señalización deRaf→Erk.....	80
Figura 32: RRas2 adopta un estado basal más activo que HRas .....	81
Figura 33: SOS1 no incrementa el intercambio intrínseco de RRas2 .....	82
Figura 34: La estimulación del receptor ejerce distintos efectos en la capacidad de RRas2 de generar Akt fosforilado .....	83

Figura 35: Mutaciones a alanina en el bucle $\beta 2$ - $\beta 3$ de RRas2, provocan una disminución de su estado activo .....	84
Figura 36: Los mutantes del giro $\beta 2$ - $\beta 3$ de Rras2 D59A y R60A también generan menos Akt fosforilado que la forma silvestre.....	85
Figura 37: La doble sustitución de los residuosR60 del giro $\beta 2$ - $\beta 3$ y E180 del HVR no restablece la actividad .....	86
Figura 38: El ITAM A de CD3 $\zeta$ es capaz de activar <i>in vitro</i> a RRas2 .....	87
Figura 39: El ITAM $\zeta$ a WT promueve el intercambio <i>in vitro</i> de nucleótido en RRas2 .....	88
Figura 40: Conservación de la secuencia de poli-prolina de RRas2 en distintas especies .....	90
Figura 41: Modelo de activación de RRas2 por parte del TCR, en células T .....	92

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Material para cultivo celular .....	17
Tabla 2: Lista de péptidos sintéticos biotinilados .....	17
Tabla 3: Reactivos.....	18
Tabla 4: Tampones y soluciones .....	19
Tabla 5: Anticuerpos .....	20
Tabla 6: Lista de plásmidos .....	21

## RESUMEN

El receptor para antígeno de células T (TCR) está formado por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) responsables del reconocimiento del ligando, y las subunidades CD3 $\gamma$ , CD3 $\zeta$ , CD3 $\epsilon$  y CD3 $\delta$ , encargadas de la transmisión de señales al interior del linfocito. Los linfocitos B, por otra parte, poseen un receptor para antígeno (BCR) formado por una molécula de inmunoglobulina de tipo IgM o IgD, anclada a membrana y unida no covalentemente al heterodímero Ig $\alpha$ -Ig $\beta$ , que juega un papel equivalente al de las subunidades CD3 en los linfocitos T.

Tanto las cadenas CD3 como las de Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  poseen, embebidas en su secuencia peptídica, unos motivos denominados ITAM (YxxL/I (x)<sub>6-8</sub>YxxL/I) sobre los que recae la tarea de la transmisión de señales iniciada desde los receptores para antígeno. Las tirosinas de este complejo son fosforiladas por Lck y se convierten así en plataformas de señalización para proteínas SH2. Siendo las más conocidas Zap70 en linfocitos T y Syk en linfocitos B, que se unen con alta afinidad al motivo ITAM doblemente fosforilado en sus tirosinas.

RRas2 pertenece a la familia Ras de GTPasas pequeñas, o monoméricas. Esta familia está formada por 150 miembros aproximadamente, cuyos ortólogos están conservados en multitud de especies. Las GTPasas monoméricas basan su funcionamiento en el intercambio de moléculas de GDP por moléculas de GTP. Cuando se encuentran unidas a GDP están en su forma inactiva, y necesitan de proteínas adicionales (GEFs) para intercambiar GDP por GTP y así poder ejercer su función. Dentro del amplio abanico de funciones en las que participan estas GTPasas destacan los procesos de diferenciación celular, proliferación y expresión génica. Además, en lo referente al sistema inmune, Ras ha demostrado ser esencial para el proceso de selección positiva de timocitos.

Investigaciones previas llevadas a cabo en nuestro laboratorio han puesto de relieve la importancia de RRas2 en las rutas de señalización del TCR. En particular en el mantenimiento de la señalización homeostática de linfocitos T mediada principalmente por la ruta de PI3K, que es reclutado por RRas2 a través de la subunidad catalítica P110 $\delta$ .

Por otra parte, también se estudiado en nuestro laboratorio el papel de RRas2 en la internalización del TCR; lo que ha determinado que RRas2 es imprescindible en el proceso fagocítico de reciclaje del TCR desde la sinapsis inmunológica.

En este trabajo, se pone de manifiesto la estrecha relación entre RRas2 y el receptor de antígeno de las células T, y como éste es necesario para una completa activación de RRas2. Por otra parte, también se demuestra la prevalencia de RRas2 frente a otras GTPasas en la vía de señalización de PI3K en linfocitos T y B. Mientras que su contribución a la ruta de Raf-MAPK es menor en este tipo de células.

## SUMMARY

The T cell antigen receptor (TCR) is composed of two subunits ( $\alpha$  and  $\beta$ ), which are responsible for antigen recognition, associated to the CD3 chains (CD3 $\gamma$ , CD3 $\zeta$ , CD3 $\epsilon$  and CD3 $\delta$ ) which propagate the signal inwards. On the other hand, B cells also possess an antigen receptor composed of an IgM or IgD molecule, to which the antigen binds, and non-covalently bound Ig-like  $\alpha$  and  $\beta$  subunits that form a heterodimer. This latter constituent plays the same role as the CD3 subunits of the TCR.

The CD3 subunits and the Ig $\alpha$  and Ig $\beta$  chains contain, embedded in their peptidic sequence, the so-called "ITAM" motif (YxxL/I (x)<sub>6-8</sub>YxxL/I). These sequences are involved in the intracellular signaling. The tyrosines in these motifs become phosphorylated by Src-kinases, such as Lck. This turns the ITAMs into signaling platforms which recruit proteins with SH2 domains, that bind specifically to these phosphorylated tyrosines. The most studied of these proteins are Zap70, for T cells, and Syk, for B cells.

RRas2 belongs to the Ras family of small or monomeric GTPases. This family encompasses approximately 150 members, whose orthologs are conserved among many species. Monomeric GTPases rely on the exchange of GDP by GTP for their function. In the GDP-bound state the GTPase is inactive and rely on GEF proteins for its activation. On the other hand, these GTPases have a very reduced hydrolytic activity and need the help of GAP proteins, which accelerate the hydrolysis rate of GTP to GDP by several orders of magnitude, thus effectively shutting down signaling.

Among the many functions that are controlled by small GTPases, cellular differentiation, proliferation, and gene expression stand-out as the most important. In the immune system, Ras has been shown to be essential for thymic positive selection.

Previous work, carried-out in our laboratory, highlighted the importance of Rras2 in the signaling routes initiated by the TCR. In particular, the maintenance of homeostatic proliferation mediated by PI3K which is recruited by Rras2 through the Ras binding domain of the P110 $\delta$  catalytic subunit. Also, recent findings from our laboratory point out to Rras2 as a critical factor in TCR internalization. Particularly, in the phagocytic internalization from the Immune Synapse.

The present work sheds light on the relationship between Rras2 and antigen receptors, and how the latter positively regulate Rras2 activity. These effects in activation are mediated by a proline-rich stretch, unique to Rras2. Regarding the signaling routes analyzed in this work, Rras2 stands out among other small GTPases in regulating the PI3K pathway in T and B cells. On the contrary, Rras2 does not seem to be a major regulatory to the MAPK route in these cells.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Ab</b>	Anticuerpo
<b>Akt (PKB)</b>	Proteína quinasa B
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígeno
<b>APS</b>	Persulfato amónico
<b>Arf</b>	Factor de ribosilación ADP
<b>BCR</b>	Receptor para antígeno de células B
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>C1</b>	Dominio de unión a diacilglicerol
<b>CC-IQ</b>	Dominio <i>coiled-coil</i> ilimaquinona
<b>CD</b>	Antígeno de diferenciación
<b>Cdc25</b>	Dominio de homología de Cdc25 (RasGEF)
<b>CF</b>	Citometría de flujo
<b>CFP</b>	Proteína cian fluorescente
<b>CR</b>	Región conservada (Raf1) (CR1, CR2, CR3)
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DH</b>	Dominio de homología a Dbl
<b>DHHC9</b>	Enzima transferasa de grupos acilo (Ras). Forma un complejo con GCP16
<b>DMEM</b>	Medio eagle modificado de Dulbecco
<b>DN</b>	Mutante dominante negativo
<b>ECL</b>	Sistema de revelado para western blot
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EF</b>	Dominio de unión a calcio
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>Em</b>	Emisión
<b>eNOS</b>	Enzima óxido nítrico sintasa del endotelio
<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señal extracelular
<b>Ex</b>	Excitación
<b>FKBP12</b>	Proteína de 12KDa asociada a FK506
<b>FWb</b>	Far-western blot

<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>FRET</b>	Transferencia de energía por resonancia
<b>FTasa</b>	Farnesil transferasa
<b>GAP</b>	Molécula potenciadora de la actividad GTPasa intrínseca de proteínas G
<b>GCP16</b>	Proteína acil-transferasa. Forma un complejo con DHHC9
<b>GDI</b>	Inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina
<b>GDP</b>	Guanosín di-fosfato
<b>GEF</b>	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
<b>Grb2</b>	Proteína 2 de unión al receptor de factores de crecimiento
<b>GSK3</b>	Glucógeno sintasa quinasa 3
<b>GST</b>	Glutation S-transferasa
<b>GTP</b>	Guanosín tri-fosfato
<b>GTPasa</b>	Proteína con capacidad intrínseca de catalizar la hidrólisis de GTP
<b>GTP<math>\gamma</math>S</b>	Guanosín tri-fosfato no hidrolizable
<b>HEPES</b>	Ácido N'-2-Etanosulfónico N-2-hidroxietilpiperacina
<b>HF</b>	Dominio con plegamiento tipo Histona
<b>HIV</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante
<b>ICMT</b>	Proteína S-isoprenilcisteína O-metiltransferasa
<b>IDP</b>	Proteína intrínsecamente desordenada
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>IMF</b>	Intensidad media de fluorescencia
<b>IP</b>	Inmunoprecipitación
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol tri-fosfato
<b>IQGAP1</b>	Proteína GAP con dominio IQ de unión a calmodulina
<b>is</b>	Isotipo
<b>IS</b>	Sinapsis inmunológica
<b>ITAM</b>	Motivo de activación basado en las tirosinas del inmunoreceptor
<b>JNK</b>	Familia de quinasas N-terminales Jun

<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>KO</b>	<i>Knock-Out</i> (deficiente para un gen en concreto)
<b>LAT</b>	Proteína de unión para la activación de células T
<b>Lck</b>	Quinasa específica de linfocitos
<b>LMP2A</b>	Proteína latente de membrana 2A
<b>Mant</b>	2 ó 3-O- <i>N</i> -Metilantroilo
<b>MAPK</b>	Familia de quinasas activadas por señales mitogénicas
<b>MBCD</b>	Metil $\beta$ -ciclodextrina
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>MEK</b>	Quinasa de MAPK/ERK
<b>min</b>	Minutos
<b>MTORC1</b>	Complejo 1 de la proteína diana de rapamicina de mamífero
<b>MTORC2</b>	Complejo 2 de la proteína diana de rapamicina de mamífero
<b>Nef</b>	Factor regulador negativo del virus de HIV/SIV
<b>NF1</b>	Neurofibromina-1 (proteína GAP)
<b>NMR</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>ONCO</b>	Mutante constitutivamente activo
<b>P6</b>	Placa de cultivo celular con 6 pocillos
<b>p96</b>	Placa de 96 pocillos para tinciones celulares
<b>P100</b>	Placa para cultivo celular de 10 cm de diámetro
<b>PA</b>	Ácido fosfatídico
<b>PAT</b>	Proteína acil-transferasa
<b>pAkt S473</b>	Forma fosforilada en la serina 473 de la proteína Akt
<b>ppErk</b>	Forma fosforilada de la proteína ERK
<b>PBL</b>	Linfocito de sangre periférica
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PBS</b>	Solución salina tamponada de fosfato
<b>PD</b>	Pull-Down (co-precipitación)
<b>PDE-6<math>\delta</math></b>	Fosfodiesterasa 6 delta
<b>PDK1</b>	Quinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos
<b>PFA</b>	Para-formaldehído
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3-quinasa



<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatilinositol (4,5)-bifosfato
<b>PIP<sub>3</sub></b>	Fosfatilinositol (3,4,5) trifosfato
<b>Pkcθ</b>	Proteína quinasa C theta
<b>Plcγ</b>	Fosfo lipasa C gamma
<b>PMA</b>	Forbol-12-miristato-13-acetato
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonio
<b>PD</b>	Pull-Down
<b>PH</b>	Dominio de homología de pleckstrina
<b>P-loop</b>	Dominio de unión a fosfato (Ras)
<b>PPII</b>	Hélice de poli-prolina de tipo 2
<b>PS</b>	Fosfatil serina
<b>PTEN</b>	Homólogo de fosfatasa y tensina
<b>Rab</b>	GTPasa monomérica de la familia Ras
<b>Raf</b>	Fibrosarcoma acelerado rápidamente (quinasa específica de serinas y treoninas)
<b>Ral-B</b>	GTPasa monomérica de la familia Ras
<b>RalGDS</b>	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina de Ral
<b>RalGEF</b>	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina de la familia de GTPasas monoméricas relacionadas con Ras
<b>Ran</b>	Proteína nuclear relacionada con Ras
<b>Ras</b>	Sarcoma de rata (oncogén relacionado)
<b>RasGRF</b>	Proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina
<b>RasGRP</b>	Proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina
<b>RBD</b>	Dominio de unión a Ras
<b>RCE1</b>	CAAX prenil-proteasa 2
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>REM</b>	Dominio de intercambio de Ras
<b>Rheb</b>	Homólogo de Ras enriquecido en cerebro
<b>Rho</b>	GTPasa monomérica de la familia de Ras
<b>RPMI</b>	Medio de Roswell Park Memorial Institute
<b>RT</b>	Temperatura ambiente
<b>s</b>	Segundos
<b>S6K</b>	Quinasa S6 ribosomal

<b>SA-PO</b>	Estreptavidina peroxidasa
<b>Src</b>	Tirosina quinasa no acoplada a receptor (familia Src)
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
<b>SEE</b>	Enterotoxina B de <i>Staphylococcus Aureus</i>
<b>SH2</b>	Dominio de homología Src de tipo 2
<b>SH3</b>	Dominio de homología Src de tipo 3
<b>Shc1</b>	Proteína transformante de tipo 1
<b>SI</b>	Sinapsis inmunológica
<b>SIV</b>	Virus de la inmunodeficiencia en simios
<b>SNID</b>	Domino de interacción de SIV-Nef con CD3ζ humano
<b>SOS1/2</b>	<i>Son of Sevenless</i> . Proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina
<b>TBS-Tween</b>	Solución salina tamponada con Tris-Tween
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilendiamina
<b>TSC1</b>	Esclerosis tuberosa 1
<b>u.a.</b>	Unidades arbitrarias
<b>WB</b>	Western blot
<b>WT</b>	Forma silvestre
<b>WW</b>	Domino de unión a poli-prolinas
<b>YFP</b>	Proteína fluorescente amarilla
<b>Zap70</b>	Quinasa asociada a la cadena ζ de 70 KDa

## MOTIVACIÓN DEL TRABAJO

Las GTPasas monoméricas de la familia Ras, entre las que se encuentra RRas2, funcionan como interruptores moleculares al unirse a moléculas de GDP o GTP y regulan multitud de redes de señalización en el citoplasma, que controlan diversas funciones esenciales para la célula. En los genes que codifican para las diversas proteínas Ras, se han descubierto mutaciones activadoras en el 25% de los cánceres humanos, lo que da una idea de la importancia que tiene la correcta regulación de esta enzima.

La motivación que subyace a este trabajo es la de desentrañar nuevos mecanismos de regulación de RRas2 en linfocitos, que sirvan para comprender mejor el mecanismo fisiológico de esta enzima, para en un futuro poder diseñar mejores terapias contra las patologías en las que RRas2 esté implicada.

## OBJETIVOS

Investigaciones llevadas a cabo en este laboratorio han puesto de manifiesto la importancia de la GTPasa RRas2 (related Ras viral oncogene homolog 2) en la señalización a través del receptor de antígeno de las células T. Por esta razón, este trabajo se ha propuesto como objetivo principal la elucidación de la relación funcional entre RRas2 y los receptores de antígeno T y B. Dentro de este marco se pueden desglosar varios objetivos concretos:

- 1. Caracterizar la unión de RRas2 a los receptores de antígeno:**
  - 1.1 Dilucidar mediante mutagénesis dirigida los residuos de RRas2 implicados en la interacción con los receptores de antígeno.
  - 1.2 Estudiar el papel de las secuencias ITAM en el reclutamiento de RRas2 a los receptores de antígeno.
  - 1.3 Medir la afinidad y propiedades cinéticas de la interacción RRas2-ITAM.
- 2. Estudiar las consecuencias de la pérdida de la interacción de RRas2 con el TCR y BCR:**
  - 2.1 Estudiar el efecto de la pérdida de asociación a los receptores de antígeno en la capacidad señalizadora de RRas2 y en su capacidad enzimática.
- 3. Investigar el papel de RRas2 en la señalización a través del TCR y BCR:**
  - 3.1 Estudiar en que vías de señalización participa predominantemente RRas2 y comparar su actividad con otras GTPasas en dichas rutas.
  - 3.2 Estudiar el efecto de la mutación de residuos no conservados del loop  $\beta 2$ - $\beta 3$  de RRas2.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Materiales

### 1.1 Líneas celulares:

La línea Jurkat es un linfoblastoma T humano establecido a partir de la sangre periférica de un varón de 14 años con leucemia linfoblástica T aguda (Schneider 1977). La variante 31-13 posee una mutación en la cadena beta del TCR que impide que este se exprese en la membrana plasmática. El clon G4 de esta variante está transfectado de manera estable con la cadena  $\beta$  HA 1.7, de manera que el TCR queda reconstituido en la membrana plasmática.

Las células Raji son una línea B linfoblástica procedente de un linfoma Burkitt humano (Pulvertaft 1964).

La línea celular CUTLL1 se estableció a partir de un linfoma T humano. Expresa tanto CD4 como CD8, y posee una mutación activadora en Notch1 (Palomero 2006).

Las jurkat, Raji y CUTLL1 se cultivan en medio RPMI 1640, suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, L-Glutamina 2mM y 100U/ml de una mezcla de penicilina y estreptomicina.

Las células COS-7 son una línea procedente de hepatocitos de riñón de mono verde africano. Se crearon a partir de células CV-1, inmortalizadas con un virus SV40 deficitario para su replicación, pero que expresa el antígeno T grande, lo que permite la replicación episomal de plásmidos que contengan el origen de replicación del virus SV40 (Jensen 1964).

La línea celular 293T deriva de hepatocitos embrionarios humanos transfectados con el antígeno T del virus SV40 (Graham 1977).

Las células COS-7 y 293T se cultivan en medio DMEM, suplementado con FBS al 10%, L-Glutamina 2mM y 100U/ml de una mezcla de penicilina y estreptomicina.

### 1.2 Células primarias

Linfocitos de sangre periférica (PBLs) humanos se extrajeron a partir de “Buffy coats”, o de sangre fresca procedente de un donante sano.

### 1.3 Reactivos

Todos los reactivos empleados en este trabajo están detallados en las siguientes tablas:

**Tabla 1: Material para cultivo celular**

Producto	Casa comercial
RPMI	servicio cultivos CBMSO
DMEM	servicio cultivos CBMSO
L-glutamina	servicio cultivos CBMSO
penicilina/estreptomicina	servicio cultivos CBMSO
FBS	Sigma
Placas y botellas para cultivo celular	BD-Falcon/Nunc

**Tabla 2: Lista de péptidos sintéticos biotinilados**

Nombre	Descripción	Secuencia
<b>ζa WT</b>	ITAM A CD3ζ humano. Secuencia silvestre.	Biotin-Ahx-GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR-NH <sub>2</sub>
<b>ζa ALAL</b>	ITAM A CD3ζ humano. Tirosinas mutadas a alanina	Biotin-Ahx-GQNQLANELNLGRREEADVLDKRR-NH <sub>2</sub>
<b>ζa YAYA</b>	ITAM A CD3ζ humano. Leucinas mutadas a alanina	Biotin-Ahx-GQNQLYNEANLGRREEYDVADKRR-NH <sub>2</sub>
<b>ζa P</b>	ITAM A CD3ζ humano. Tirosinas fosforiladas. Secuencia silvestre.	Biotin-Ahx-GQNQLY(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )NELNLGRREEY(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )DVLDKRR-NH <sub>2</sub>
<b>ζa ALYL</b>	ITAM A CD3ζ humano. Primera tirosina mutada a alanina.	Biotin-Ahx-GQNQLANELNLGRREEYDVLDKRR-NH <sub>2</sub>
<b>ζa YLAL</b>	ITAM A CD3ζ humano. Segunda tirosina mutada a alanina.	Biotin-Ahx-GQNQLYNELNLGRREEADVLDKRR-NH <sub>2</sub>
<b>ζa Nt</b>	Primera mitad ITAM ζa silvestre.	Biotin-Ahx-GQNQLYNELNLGRR-NH <sub>2</sub>
<b>ζa Ct</b>	Segunda mitad ITAM ζa silvestre.	Biotin-Ahx-EEYDVLDKRRGRDP-NH <sub>2</sub>

<b>ζa Ct mut 1</b>	Mutación Y-A en ζa Ct	Biotin-Ahx-EEADVLDKRRGRDP-NH <sub>2</sub>
<b>ζa Ct mut 2</b>	Mutación D-A en ζa Ct	Biotin-Ahx-EEYAVLDKRRGRDP-NH <sub>2</sub>
<b>ζa Ct mut 3</b>	Mutación L-A en ζa Ct	Biotin-Ahx-EEYDVADKRRGRDP-NH <sub>2</sub>
<b>ζa Ct mut 4</b>	Mutación KRR-AAA en ζa Ct	Biotin-Ahx-EEYDVLDAAAGRDP-NH <sub>2</sub>
<b>Igα</b>	ITAM Igα BCR humano. Secuencia silvestre	Biotin-Ahx-DENLYEGLNLDDCSMYEDISRGL-NH <sub>2</sub>
<b>Igβ</b>	ITAM Igβ BCR humano. Secuencia silvestre	Biotin-Ahx-EEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLR-NH <sub>2</sub>

**Tabla 3: Reactivos**

<b>Reactivo/Producto</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Aplicación</b>
<b>Sales orgánicas, ácidos, bases y disolventes</b>	Sigma, Panreac, Merck.	Varios
<b>Cubetas de electroporación de 0.4 cm</b>	Bio-Rad	Transfección de líneas celulares de mamífero
<b>Cubetas de nucleofección de 0.2 cm</b>	Mirus bio/Amaza	Nucleofección de PBLs humanos y células Raji
<b>Membranas de nitrocelulosa de 0.2μm</b>	Bio-Rad	WB
<b>TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina)</b>	Bio-Rad	Geles SDS-PAGE
<b>APS</b>	Sigma	Geles SDS-PAGE
<b>Pierce ECL West Dura substrate</b>	Thermo Scientific	WB
<b>Heparina sódica</b>	Chiesi	Extracción de PBLs humanos frescos
<b>PP2</b>	Calbiochem	Inhibidor de Src-quinasas
<b>GDP</b>	Sigma	Ensayos de intercambio de nucleótidos

<b>GTP</b>	Sigma	Ensayos de intercambio de nucleótidos / PD
<b>GTP<math>\gamma</math>S</b>	Jena Bioscience	Ensayos de intercambio de nucleótidos
<b>Mant-GDP</b>	Jena Bioscience	Ensayo de intercambio de nucleótidos
<b>Mant-GTP<math>\gamma</math>S</b>	Jena Bioscience	Ensayo de intercambio de nucleótidos
<b>Ortovanadato sódico</b>	Sigma	Inhibidor de fosfatasas
<b>Leupeptina</b>	Sigma	Inhibidor de proteasas
<b>Benzamidina</b>	Sigma	Inhibidor de proteasas
<b>PMSF</b>	Sigma	Inhibidor de proteasas
<b>Ficoll-Paque Plus</b>	GE-Healthcare	Obtención de PBLs humanos
<b>Estreptavidina-sefarosa</b>	GE-Healthcare	Pull-Down de péptidos biotinilados
<b>Proteína G-sefarosa</b>	GE- Healthcare	Inmunoprecipitación en líneas celulares
<b>Chips Biacore (Ni-NTA, CM5)</b>	GE Healthcare	Medidas de afinidad en Biacore
<b>BSA</b>	Rockland Immunochemicals	Disuelta en PBS1x. Pull-Down/inmunoprecipitación

**Tabla 4: Tampones y soluciones**

<b>Solución</b>	<b>Composición</b>	<b>Aplicación</b>
<b>SOLUCIONES</b>		
<b>PBS 1x</b>	NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2mM. pH 7.4	Varias
<b>TBS1x</b>	Tris-HCl 50mM, NaCl 276mM, KCl 54mM. pH 8	WB
<b>Buffer CF</b>	PBS 1x, azida sódica 0.02%, BSA 1%	CF
<b>TBS-TWEEN</b>	TBS 1x, Tween 0.1%	WB
<b>Buffer nucleofección PBLs humanos</b>	PBS1x, Hepes pH 7.4 25mM, FBS 20%	Transfección de células primarias de mamífero
<b>Buffer transfección Jurkat/31-13/CUTLL1</b>	RPMI, Hepes 10mM, FBS 20%	Transfección de células de mamífero
<b>Buffer nucleofección Raji</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 90mM, KCl 5mM, MgCl <sub>2</sub> 10mM, Hepes pH 7.4 20mM, succinato sódico 24mM	Transfección de células de mamífero

<b>Buffer transfección COS-7</b>	DMEM, Hepes 10mM, FBS 10%	Transfección células de mamífero
<b>Buffer transfección 293T</b>	Cationes lipídicos (jet-peí)	Transfección de células de mamífero
<b>TAMPONES</b>		
<b>Tampón FWb</b>	Brij96v 0.5%, MgCl <sub>2</sub> 5mM, NaCl 150mM, Hepes 25mM pH 7.4.	Ensayos de Far western blot
<b>Tampón de lisis PD <i>in-vivo/in-vitro</i></b>	Brij96v 0.5%, Hepes 25mM pH 7.4, NaCl 150mM, MgCl <sub>2</sub> 10mM, inhibidores de proteasas y fosfatasas	Ensayos de Pull-Down con péptidos biotinilados y con GST-RBD
<b>Tampón de lisis para IP</b>	NP40 1%, Hepes 25mM pH 7.4, NaCl 150mM, MgCl <sub>2</sub> 10mM, EDTA 1mM, inhibidores de proteasas y fosfatasas	Ensayos de IP en líneas celulares
<b>Tampón intercambio GTPasa</b>	20mM Tris pH 7.5, 200mM NaCl, 10mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT, 5% glicerol	Ensayos de intercambio de nucleótidos (mant)
<b>TAMPONES PARA GELES SDS-PAGE</b>		
<b>Tampón de carga 1x no-reductor</b>	Glicerol 10%, SDS 3%, azul de bromofenol	SDS-PAGE
<b>Tampón del gel concentrador (lower)</b>	Tris pH 6.8 0.4 M, SDS 0.4%	SDS-PAGE
<b>Tampón del gel separador (upper)</b>	Tris pH 8.8 1.5 M, SDS 0.4%	SDS-PAGE

**Tabla 5: Anticuerpos**

Ab	clon	is	especie/reactividad	tipo	casa comercial	uso
<b>ANTICUERPOS PRIMARIOS/CONJUGADOS</b>						
<b>Anti-CD3</b>	OKT3	IgG <sub>2a</sub>	Ratón/humano	Estimulación	-	10ug/ml
<b>Anti-pAkt (S473)</b>	9271	policlonal	conejo/humano	CF	Cell Signaling	1:100
<b>Anti-ppERK (Thr202/Tyr204)</b>	9101	policlonal	conejo/humano	CF	Cell Signaling	1:100
<b>Anti-RRas2</b>	2D3-4B8	IgG <sub>1</sub>	ratón/humano	WB	Sigma	1:1000
<b>Anti-GFP</b>	7.1 y 13.1	IgG <sub>1κ</sub>	ratón/humano	WB	Roche Applied	1:1000



					Science	
<b>Anti-TC21</b>	72-3/C2	policlonal	conejo/humano	WB	-	1:3000
<b>Anti-CD4 PC5</b>	13B8.2	IgG <sub>1</sub>	ratón/humano	CF	Beckman Coulter	1:100
<b>Anti-CD8 PE-Cy7</b>	RPAT8	IgG <sub>1</sub>	ratón/humano	CF	BD Pharmingen	1:200
<b>Anti-CD25-APC</b>	BC96	IgG <sub>1</sub>	ratón/humano	CF	eBioscience	1:100
<b>Anti-IgM (Fc5m)</b>	609-4131	policlonal	conejo/humano	estimulación	Rockland Immunochemicals	10ug/ml
<b>Anti-HA</b>	12CA5	IgG <sub>2b</sub>	ratón/humano	IP/WB	Miguel Ángel Alonso	1ug/ul/1:1000
<b>Anti-GST (Nck)</b>	145-203	policlonal	Conejo/humano	WB	-	1:3000
<b>ANTICUERPOS SECUNDARIOS</b>						
<b>Estreptavidina peroxidasa</b>	RPN1231	-	-	FWb	GE Healthcare	1:10000
<b>Anti-ratón F(ab')<sub>2</sub> peroxidasa</b>	NA9310	IgG	oveja/ratón	WB	GE Healthcare	1:5000
<b>Anti-conejo F(ab')<sub>2</sub> peroxidasa</b>	NA9340	IgG	burro/conejo	WB	GE Healthcare	1:5000
<b>Alexa-647</b>	A-31573	IgG	burro/conejo IgGs	CF	Invitrogen	1:200
<b>Estreptavidina-APC</b>	554067	-	-	CF	BD Pharmingen	1:200

**Tabla 6: Lista de plásmidos**

Nombre	Plásmido	Origen	Descripción
<b>VECTORES DE EXPRESIÓN EN CÉLULAS DE MAMÍFERO</b>			
<b>RRas2 G23V (onco)-GFP</b>	pEGFP C1	Introducción de la mutación G23V por mutagénesis dirigida (stratagene)	Forma constitutivamente activa de RRas2 fusionada a GFP
<b>RRas2 S28N (dn)-GFP</b>	pEGFP C1	Introducción de la mutación S28N por mutagénesis dirigida (stratagene)	Forma dominante negativa de RRas2 fusionada a GFP
<b>RRas2 WT-</b>	pEGFP C1	clonaje por PCR del cDNA humano	Forma silvestre de RRas2

<b>GFP</b>		<b>de TC21</b>	<b>fusionada a GFP</b>
<b>RRas2 D59A-GFP</b>	pEGFP C1	Introducción de la mutación D59A por mutagénesis dirigida (stratagene)	Mutante D59A de RRas2
<b>RRas2 R60A-GFP</b>	pEGFP C1	Introducción de la mutación R60A por mutagénesis dirigida (stratagene)	Mutante R60A de RRas2
<b>RRas2 P184A-GFP</b>	pEGFP C1	Introducción de la mutación P184A por mutagénesis dirigida (stratagene)	Mutante la región de poli-prolina de RRas2
<b>RRas2 P185A-GFP</b>	pEGFP C1	Introducción de la mutación P185A por mutagénesis dirigida (stratagene)	Mutante en la región de poli-prolina de RRas2
<b>RRas2 P187A-GFP</b>	pEGFP C1	Introducción de la mutación P187A por mutagénesis dirigida (stratagene)	Mutante en la región de poli-prolina de RRas2
<b>RRas2 P189A-GFP</b>	pEGFP C1	Introducción de la mutación P189A por mutagénesis dirigida (stratagene)	Mutante en la región de poli-prolina de Rras2
<b>Rras2 S186E-GFP</b>	pEGFP C1	Introducción de la mutación S186E por mutagénesis dirigida (stratagene)	Mutante en la región de poli-prolina de RRas2
<b>RRas2 S186A-GFP</b>	pEGFP C1	Introducción de la mutación S186A por mutagénesis dirigida (stratagene)	Mutante en la región de poli-prolina de RRas2
<b>RRas2 F178A-GFP</b>	pEGFPC1	Introducción de la mutación F178A por mutagénesis dirigida (stratagene)	Mutante en la región c-terminal de RRas2
<b>RRas2 Q179A-GFP</b>	pEGFPC1	Introducción de la mutación Q179A por mutagénesis dirigida (stratagene)	Mutante en la región c-terminal de RRas2
<b>RRas2 E180A-GFP</b>	pEGFPC1	Introducción de la mutación E180A por mutagénesis dirigida (stratagene)	Mutante en la región c-terminal de RRas2
<b>RRas2 Q181A-GFP</b>	pEGFPC1	Introducción de la mutación Q181A por mutagénesis dirigida (stratagene)	Mutante en la región c-terminal de RRas2
<b>RRas2 C183A-GFP</b>	pEGFPC1	Introducción de la mutación C183A por mutagénesis dirigida (stratagene)	Mutante en la región c-terminal de RRas2
<b>RRas2 E188A-GFP</b>	pEGFPC1	Introducción de la mutación E188A por mutagénesis dirigida (stratagene)	Mutante en la región de poli-prolina de RRas2

<b>KRas WT-GFP</b>	pEGFPC1	Clonaje del cDNA de KRas4b humano	Forma silvestre de KRas 4b fusionada a GFP
<b>KRas ONCO-GFP</b>	pEGFPC1	Introducción de la mutación G12V por mutagénesis dirigida (stratagene)	Forma oncogénica de KRas 4b
<b>KRas DN-GFP</b>	pEGFPC1	Introducción de la mutación S17N por mutagénesis dirigida (stratagene)	Forma dominante-negativa de KRas 4b
<b>RRas2 WT-P110D RBD</b>	Biosensor	Clonaje por PCR del CDS de RRas2 humano y el RBD de P110δ humanos.	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes, Cerulean y Venus
<b>RRas2 ONCO-P110D RBD</b>	Biosensor	Clonaje por PCR de RRas2 G23V y el RBD de P110δ humanos	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes, Cerulean y Venus
<b>RRas2 DN-P110δ RBD</b>	Biosensor	Clonaje por PCR de RRas2 S28N y el RBD de P110δ humanos	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes, Cerulean y Venus
<b>RRas2 WT-Raf1 RBD</b>	Biosensor	Clonaje por PCR de RRas2 WT y el RBD de Raf1 humanos	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes, Cerulean y Venus
<b>RRas2 ONCO-Ras1 RBD</b>	Biosensor	Clonaje por PCR de RRas2 ONCO y el RBD de Raf1 humanos	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes, Cerulean y Venus
<b>RRas2 DN-Raf1 RBD</b>	Biosensor	Clonaje por PCR de RRas2 DN y el RBD de Raf1 humanos	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes, Cerulean y Venus
<b>RRas2 P187A-P110δ RBD</b>	Biosensor	Introducción de la mutación P187A en RRas2 wt- P110δ por mutagénesis dirigida (stratagene)	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes, Cerulean y Venus
<b>RRas2 S186E-P110δ RBD</b>	Biosensor	Introducción de la mutación S186E en RRas2 wt- P110δ por mutagénesis dirigida (stratagene)	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes, Cerulean y Venus
<b>RRas2 S186A-P110δ</b>	Biosensor	Introducción de la mutación S186A en RRas2 wt- P110δ por mutagénesis dirigida (stratagene)	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes, Cerulean y

<b>RBD</b>			Venus
<b>RRas2 D59A- P110δ RBD</b>	Biosensor	Introducción de la mutación D59A en RRas2 wt- P110δ por mutagénesis dirigida (stratagene)	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes, Cerulean y Venus
<b>RRas2 R60A- P110δ RBD</b>	Biosensor	Introducción de la mutación R60A en RRas2 wt- P110δ por mutagénesis dirigida (stratagene)	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes, Cerulean y Venus
<b>RRas2 E180A- P110δ RBD</b>	Biosensor	Introducción de la mutación E180A en RRas2 wt- P110δ por mutagénesis dirigida (stratagene)	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes, Cerulean y Venus
<b>RRas2 P184A- P110δ RBD</b>	Biosensor	Introducción de la mutación P184A en RRas2 wt- P110δ por mutagénesis dirigida (stratagene)	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes, Cerulean y Venus
<b>RRas2 P185A- P110δ RBD</b>	Biosensor	Introducción de la mutación P185A en RRas2 wt- P110δ por mutagénesis dirigida (stratagene)	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes, Cerulean y Venus
<b>RRas2 E188A- P110δ RBD</b>	Biosensor	Introducción de la mutación E188A en RRas2 wt- P110δ por mutagénesis dirigida (stratagene)	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes, Cerulean y Venus
<b>RRas2 P189A- P110δ RBD</b>	Biosensor	Introducción de la mutación P189A en RRas2 wt- P110δ por mutagénesis dirigida (stratagene)	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes, Cerulean y Venus
<b>HRas WT- P110δ RBD</b>	Biosensor	CDS de HRas humano junto con el RBD de P110δ humano. Construido a partir del vector pCEFL-HA-HRas WT (X. Bustelo) y el vector Biosensor TC21 wt- P110δ RBD.	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes Cerulean y Venus
<b>HRas ONCO- P110δ RBD</b>	Biosensor	CDS de HRas humano (forma oncogénica G12V) junto con el RBD de P110d humano. Construido a partir del vector pSG-V12HRas (X. Bustelo) y el vector Biosensor TC21 wt- P110δ RBD.	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes Cerulean y Venus

<b>HRas DN-P110δ RBD</b>	Biosensor	CDS de HRas humano (forma dominante negativa S17N) junto con el RBD de P110δ humano. Construido a partir del vector pXRB020(X. Bustelo) y el Biosensor TC21 wt- P110δ RBD.	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes Cerulean y Venus
<b>HRas WT-Raf1 RBD</b>	Biosensor	Clonaje del CDS de HRas wt humano junto con el RBD de Raf1	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes Cerulean y Venus
<b>HRas ONCO-Raf1 RBD</b>	Biosensor	Clonaje del CDS de HRas ONCO (G12V) humano junto con el RBD de Raf1	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes Cerulean y Venus
<b>HRas DN-Raf1 RBD</b>	Biosensor	Clonaje del CDS de HRas DN (S17N) humano junto con el RBD de Raf1	Construcción en tándem junto con las proteínas fluorescentes Cerulean y Venus
<b>HA-LMP2A</b>	pSG5	Richard Longnecker. Northwestern Medical School, Chicago.	Forma silvestre de LMP2A (EBV) fusionada a HA
<b>VECTORES DE EXPRESIÓN EN BACTERIAS</b>			
<b>GST-VACÍO (control)</b>	pGEX 4T3	GE Healthcare	Proteína GST humana para ensayos de Pull-Down/Biacore
<b>GST-RRas2 WT</b>	pGEX 4T3	Clonaje del cDNA humano de RRas2 con las enzimas XhoI y BamHI	Forma silvestre de RRas2. Ensayos de Pull-Down/Biacore.
<b>GST-RRas2 ONCO</b>	pGEX 4T3	Clonaje por PCR con las dianas XhoI y BamHI desde el vector X140 (X. Bustelo)	Forma constitutivamente activa de RRas2 (G23V). Ensayos de Pull-Down/Biacore
<b>GST-RRas2 DN</b>	pGEX 4T3	Clonaje por PCR con las dianas XhoI y BamHI. Desde el vector pLEGFP C1- RRas2 S28N	Forma dominante negativa de RRas2 (S28N). Ensayos de Pull-Down/Biacore.
<b>GST-Raf-1 RBD</b>	pGEX 4T3	Región comprendida entre los aminoácidos 1-149 de Raf1 fusionada a GST	Forma silvestre de Raf-1 RBD humano.
<b>GST-p110δ RBD</b>	pGEX 4T3	Secuencia del RBD (aminoácidos 187-278) de p110δ fusionado a GST	Forma silvestre de p110δ RBD humano

<b>RRas2 WT-His<sub>6</sub></b>	pET 28b	Clonaje de RRas2 WT fusionado a secuencia de poli-histidinas (6x) en su N-terminal	Ensayos de FWb y Biacore
<b>RRas2 ONCO-His<sub>6</sub></b>	pET28b	Clonaje de la forma oncogénica (G12V) de RRas2 fusionado a secuencia de poli-histidinas (6x) en su N-terminal	Ensayos de Biacore
<b>RRas2 DN-His<sub>6</sub></b>	pET28b	Clonaje de la forma dominante-negativa (S28N) de RRas2 fusionado a secuencia de poli-histidinas (6x) en su N-terminal	Ensayos de Biacore
<b>RRas2 P187A-His<sub>6</sub></b>	pET28b	Introducción de la mutación P187A por mutagénesis dirigida (stratagene)	Ensayos de FWb
<b>RRas2 P189A-His<sub>6</sub></b>	pET28b	Introducción de la mutación P189A por mutagénesis dirigida (stratagene)	Ensayos de FWb
<b>Hras WT-His<sub>6</sub></b>	-	Proteína recombinante Hras silvestre, con cola de poli-histidinas (6x) en su N-terminal (cytoskeleton)	Ensayos de intercambio de nucleótidos
<b>SOS1-His<sub>6</sub></b>	-	Dominio de intercambio de SOS1 humano (564-1049). Unido a cola de poli-histidina (6x) en su N-terminal (cytoskeleton)	Ensayos de intercambio de nucleótidos

## 2. Métodos

### 2.1 Obtención de células primarias

#### 2.1.1 Obtención de linfocitos de sangre periférica humana

Los PBLs humanos se obtuvieron, bien a partir de un concentrado leucocitario de aproximadamente 450ml de sangre venosa, o de una extracción de 50ml de sangre venosa de un donante sano. Para su aislamiento y purificación se siguió una serie de pasos: i) la sangre (50 ml) se diluyó con PBS1x y la mezcla se depositó sobre 15ml de ficoll hasta completar un volumen total de 50ml; ii) a continuación se centrifugaron a 600g durante 30 minutos y se recolectó la interfaz resultante entre los eritrocitos y el suero; iii) finalmente se lavó tres veces con PBS1x y se procedió al conteo de las células.



## 2.2 Transfección/Nucleofección de líneas celulares

Las células Jurkat así como su variante 31-13 y la línea CUTLL1, se transfectaron transitoriamente por electroporación (BioRad). Se tomaron 10 millones de células y se resuspendieron en 500µl de RPMI + FBS 20%, junto con 50µg del DNA correspondiente, en una cubeta de 0.4 cm de anchura. A continuación se realizó la electroporación con las siguientes condiciones: 960µF de capacitancia, y una diferencia de potencial de 260v. Tras la electroporación, las células se trasladaron inmediatamente a una placa p100 con 10ml de medio de cultivo. Las células se utilizaron pasadas 12-24h de transfección, una vez que se comprobó previamente por FACS si expresaban la construcción correspondiente.

Las células Raji se transfectaron mediante nucleofección usando cubetas de 0.2cm. Se tomaron 10 millones de células y se resuspendieron junto con 10ug del plásmido correspondiente, en 100µl del buffer especificado en la (Tabla 4). A continuación se nucleofectaron (Amaza I, Lonza) utilizando los parámetros del protocolo M-13 de amaza. Una vez nucleofectadas, se resuspendieron en una P100 con su medio de cultivo.

Las células COS-7 se transfectaron por electroporación. Se tomaron 10 millones de células y se resuspendieron en 200µl de medio DMEM + Hepes 10mM pH 7.4 + FBS 10%, junto con 5µg de DNA, 5µl de NaCl 150mM, y 20µg de esperma de salmón (actúa como portador). Las condiciones de electroporación fueron las siguientes: 200v de diferencia de potencial y 960µF. Después de electroporar, se trasladaron las células a un p100 con 10ml de su medio de cultivo.

Las células 293T se transfectaron mediante cationes lipídicos (jet-peí), según el protocolo del fabricante. Las células se resuspendieron en una P100 con 10ml de su medio de cultivo.

## 2.3 Nucleofección de PBLs humanos

Se usaron aproximadamente cinco millones de células, previamente purificadas (ver Obtención de linfocitos de sangre periférica humana). Se centrifugaron a 600g y resuspendieron en 100µl de PBS1x + Hepes 10mM + 20% FBS, junto con 5µg del DNA correspondiente. Seguidamente se introdujo la mezcla en una cubeta de 0.2 cm de anchura, y se nucleofectaron las células seleccionando el programa U-14 del nucleofector (Amaza I, Lonza). A continuación se tomaron las células y se trasladaron a una placa P6 con 1 ml de su medio de cultivo, siendo recogidas al cabo de 12-16h.

## 2.4 Ensayos de Pull-Down e Inmunoprecipitación

### 2.4.1 Pull-Down con GST-Raf1-RBD /GST-P110δ-RBD en lisados celulares

En estos experimentos se utilizaron células 293T o COS-7 transfectadas con plásmidos de RRas2-GFP. Se recogieron las células de una placa con 2ml de PBS1x y se trasladaron a un tubo eppendorf de 1.5ml. A continuación, se centrifugaron 5 minutos a 500 g y el pellet se resuspendió en 500µl de tampón de lisis. Este se lisó a una

temperatura de 4°C con agitación, durante 30 minutos. A continuación, se centrifugó a 5000g durante 15' para eliminar los restos celulares. Se tomaron 50 µl del lisado como control de carga. Posteriormente, se incubaron durante 30 minutos a RT con el péptido correspondiente, junto con GTP 1mM. Pasado este tiempo, se añadió 1µg del GST-RBD correspondiente, y se dejó incubando 1h a RT. Finalmente, se centrifugó y lavó tres veces con el tampón de lisis indicado (Tabla 4). Después de los lavados el pellet se resuspendió en un buffer de carga no-reductor.

En los experimentos de activación *in-vitro* se añadió GTP hidrolizable a los lisados, al mismo tiempo de la adición del péptido de ITAM ζa WT y la del GST-RBD correspondiente.

#### 2.4.2 Pull-down con péptidos biotinilados en lisados celulares

Para estos experimentos se utilizaron células COS-7 transfectadas con plásmidos de GFP-RRas2. Las células se recogieron con PBS1x + EDTA 10mM y se trasladaron a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se lisaron en el tampón indicado en 500 µl de volumen junto con GTP 1mM. Se centrifugó el lisado a 5000 g para eliminar los restos celulares y de este volumen se tomaron 50µl como control de carga. El resto del lisado se incubó con el péptido indicado durante 2h a 4°C en agitación. Posteriormente, se añadieron 20µl de bolas de estreptavidina sefarosa y se incubaron 12h a 4°C. A continuación se centrifugaron a 4000 g y el pellet se lavó sucesivas veces con el tampón de lisis y se resuspendió en un buffer de carga no-reductor.

#### 2.4.3 Pull-Down con péptidos biotinilados *in-vitro*

En este tipo de experimento se utilizó proteína GST-RRas2 recombinante y GST-vacío como control negativo de unión. A un volumen de 200µl de tampón de lisis se añadieron 3µg de proteína GST-RRas2 junto con 20µl de bolas de estreptavidina-sefarosa y BSA 2mg/ml, incubándose durante 1h a RT. Este proceso se repitió tres veces para descartar uniones inespecíficas. Posteriormente se añadieron a la reacción 20µl de bolas de estreptavidina-sefarosa que previamente habían sido incubadas con 10µg del péptido biotinilado correspondiente durante 1h a 4°C. Esta mezcla se incubó 1h y se centrifugó. El pellet se lavó tres veces en su tampón de lisis y se resuspendió en un buffer de carga no-reductor. Como control de carga se separaron 10 µl del total del volumen de incubación, antes del Pull-Down.

#### 2.4.4 Inmunoprecipitación en líneas celulares

Las células COS-7 transfectadas con los plásmidos indicados se recogieron con PBS1x + EDTA 10mM. A continuación se lisó cada punto en 500µl de tampón de lisis (Tabla 4) durante 1h a 4°C en agitación. En este punto se tomaron 50µl del lisado como control de carga. El resto del lisado se incubó con 2µg de anticuerpo (anti-HA) durante 2h a 4°C. A continuación se añadieron 20µl de bolas de proteína G-sefarosa, junto con



BSA a 2mg/ml. Se dejó incubando 12h a 4°C en agitación. El pellet se lavó tres veces con tampón de lisis y se resuspendió en un buffer de carga no-reductor.

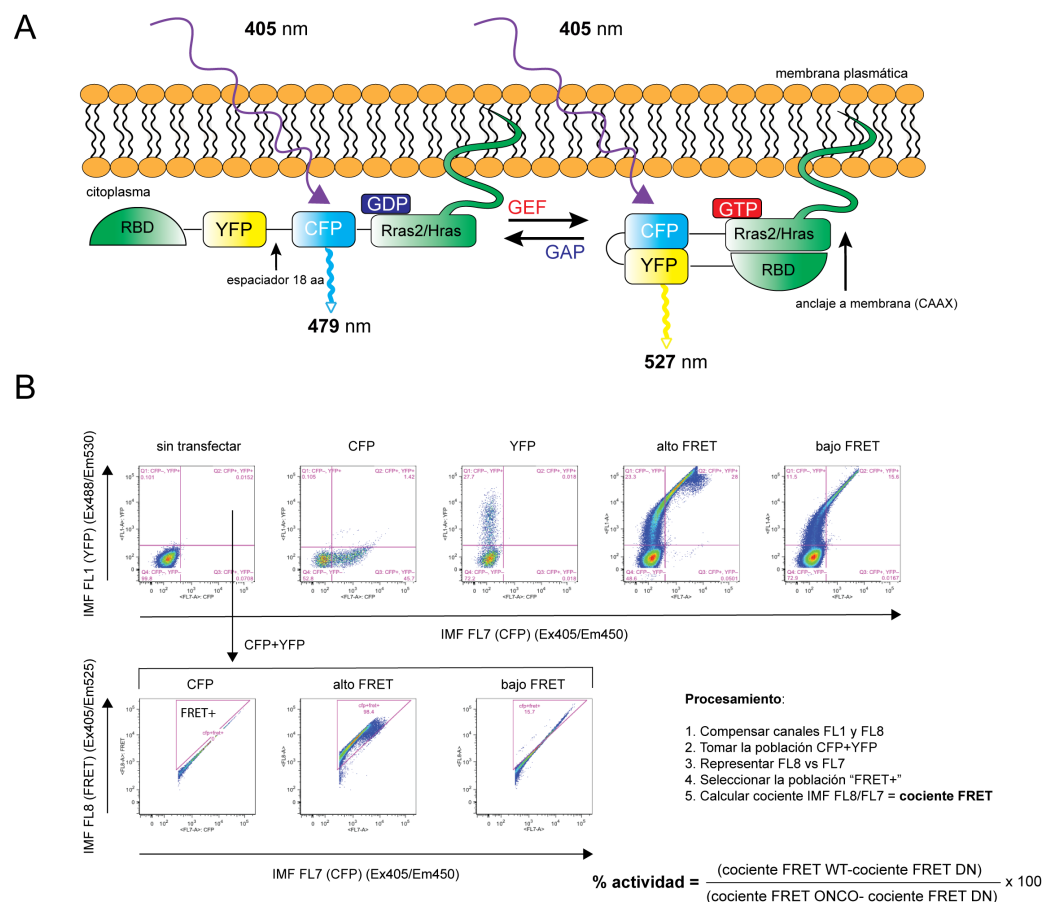
### 2.4.5 Far-western blot

En los experimentos de Far-western blot (FWb) se cargaron las proteínas recombinantes en geles de 10 pocillos, 5µg de proteína por pocillo, en buffer no-reductor (sin hervir). Una vez transferida la membrana se recortó cada carril y se incubó 12h a 4°C con el péptido biotinilado correspondiente en tubos de tapón rojo con 10ml de tampón (Tabla 4). Para el análisis densitométrico de las bandas se utilizó un densitómetro calibrado Bio-Rad GS-900 (Bio-Rad).

## 2.5 Citometría

### 2.5.1 FRET en células vivas

Se transfectaron las células con el biosensor indicado ( Figura 1) y se dejó un tiempo de expresión de 12-16h hasta la medición en el citómetro de flujo. Para las PBLs se emplearon los anticuerpos anti-CD4-PC5 y/o anti-CD8PECy7 para distinguir la población de células T. En todos los casos las tinciones de superficie se realizaron a 4°C (15 minutos tanto para primario como para secundario) y en buffer CF.



**Figura 1: FRET por citometría de flujo:** A) Representación esquemática del funcionamiento del biosensor FRET. B) Flujo de trabajo para calcular la señal FRET del biosensor, en el citómetro de flujo.

Posteriormente, las células se resuspendieron en RPMI + Hepes 10mM para ser medidas en el citómetro de flujo. Tanto el funcionamiento del biosensor, como el proceso de análisis de FRET, se explican en la Figura 1. A su vez, este procedimiento está adaptado a partir del descrito en (Banning 2010). Para estas medidas se empleó un citómetro de flujo FACS CANTO II (Becton Dickinson), equipado con las siguientes líneas de láser para FRET: FL1 (Venus), FL7 (Cerulean) y FL8 (FRET). Para poner a punto el protocolo se emplearon dos controles denominados “alto FRET” y “bajo FRET” (Figura 1).

### 2.5.2 Medición de pAkt s473 y ppErk en células fijadas.

Se transfectaron las células con los plásmidos correspondientes y se cultivaron durante 16-24h. Posteriormente, se centrifugaron y resuspendieron en medio sin FBS durante 2-3h para disminuir los niveles basales de activación (excepto en PBLs). A continuación, se centrifugaron y el pellet se resuspendió en para-formaldehído (PFA) al 2% durante 10-15 minutos, a RT, para fijar las células. Después se procedió a su permeabilización con metanol al 90% durante 30-60 minutos a 4°C. En el caso de PBLs, éstas se tiñeron en superficie (anti-CD4/anti-CD8) antes de fijarlas. Posteriormente, se fijaron con PFA al 2% durante 10 minutos a RT. Para el proceso de permeabilización se empleó NP40 al 0.1% durante 5 minutos a RT.

Una vez fijadas y permeabilizadas se centrifugaron 5 minutos a 500g, se lavaron 2 veces con PBS1x y se resuspendieron en 100µl de buffer CF para pasarlas a una placa p96 de fondo en “u”. Para el proceso de tinción se resuspendieron las células en 50µl de buffer CF, más el anticuerpo primario correspondiente (pAktS473 o ppErk), a la dilución especificada en la Tabla 5. Tanto el anticuerpo primario como el secundario (Alexa 647) se incubaron durante 15 minutos a RT. En el caso de PBLs, el anticuerpo primario se dejó incubando 12h a 4°C. En una etapa intermedia se realizó un lavado con Buffer CF en 100µl de volumen. Después de incubar con el secundario se hizo un lavado final con Buffer CF y se pasaron las muestras por el citómetro (FACS CANTO II, Becton Dickinson). Para el análisis GFP vs pAkt/ppErk sólo se representaron las células positivas para ambos canales.

### 2.6 Medidas de afinidad Rras2-CD3ζ (Biacore)

Para este tipo de experimentos se emplearon dos tipos de chips, dependiendo del tipo de inmovilización. Los chips con superficie de dextrano (CM5) se usaron con las proteínas GST-RRas2. En este caso, GST-RRas2 se inmovilizó directamente al chip mediante acoplamiento de aminos. En el caso de las proteínas RRas2 con cola de histidinas (His<sub>6</sub>) se utilizaron chips con recubrimiento de Ni<sup>2+</sup> (Ni-NTA) para acoplar directamente la proteína RRas2 al chip. En el caso de las construcciones fusionadas a GST se acopló GST-vacío en la celda de referencia del chip, para descartar uniones inespecíficas al GST.

## 2.7 RMN del ITAM $\zeta_a$

El péptido biotinilado del ITAM  $\zeta_a$  se disolvió en H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1 pH 7.0 a razón de 1mg/550 $\mu$ l. Se asignaron espectros de <sup>1</sup>H (2D COSY, TOCSY, NOESY) a 5°C mediante un espectrómetro Bruker AV-800.

## 2.8 Ensayos de intercambio de nucleótidos

El fluoróforo mant se excita con una longitud de onda de 355 nm y tiene su máximo de emisión en 448 nm. En solución, muestra una fluorescencia muy baja, que aumenta considerablemente cuando el entorno es no-polar, o al unirse a proteínas (en este caso, unido a GDP o GTP). En este tipo de experimentos se usaron proteínas recombinantes con cola de histidinas (His<sub>6</sub>) que no habían sido cargadas previamente con ningún nucleótido. En el caso de los experimentos con el GEF SOS1 se preparó una mezcla en tampón de intercambio GTPasa, de RRas2 (400nM) o HRas (400nM) silvestres, con mant-GTP (hidrolizable, 400nM) y se realizaron lecturas cada 30s durante 5 ciclos hasta obtener una lectura estable (pasados 15 minutos). A continuación, se añadieron 10 $\mu$ l de buffer (control) o buffer + SOS1 600nM. Para la comparación entre RRas2 WT y los mutantes de prolina se preparó una mezcla consistente en la proteína y el buffer que se añadieron conjuntamente en la placa (p96 blanca de fondo u) y a continuación se agregó el nucleótido correspondiente para comenzar a medir la fluorescencia. Para las medidas en las que se agregó péptido  $\zeta_a$ , antes de añadir el nucleótido marcado, se midió la fluorescencia correspondiente a la proteína y al péptido, para establecer una línea base que posteriormente se restó de las medidas de fluorescencia del fluoróforo mant.

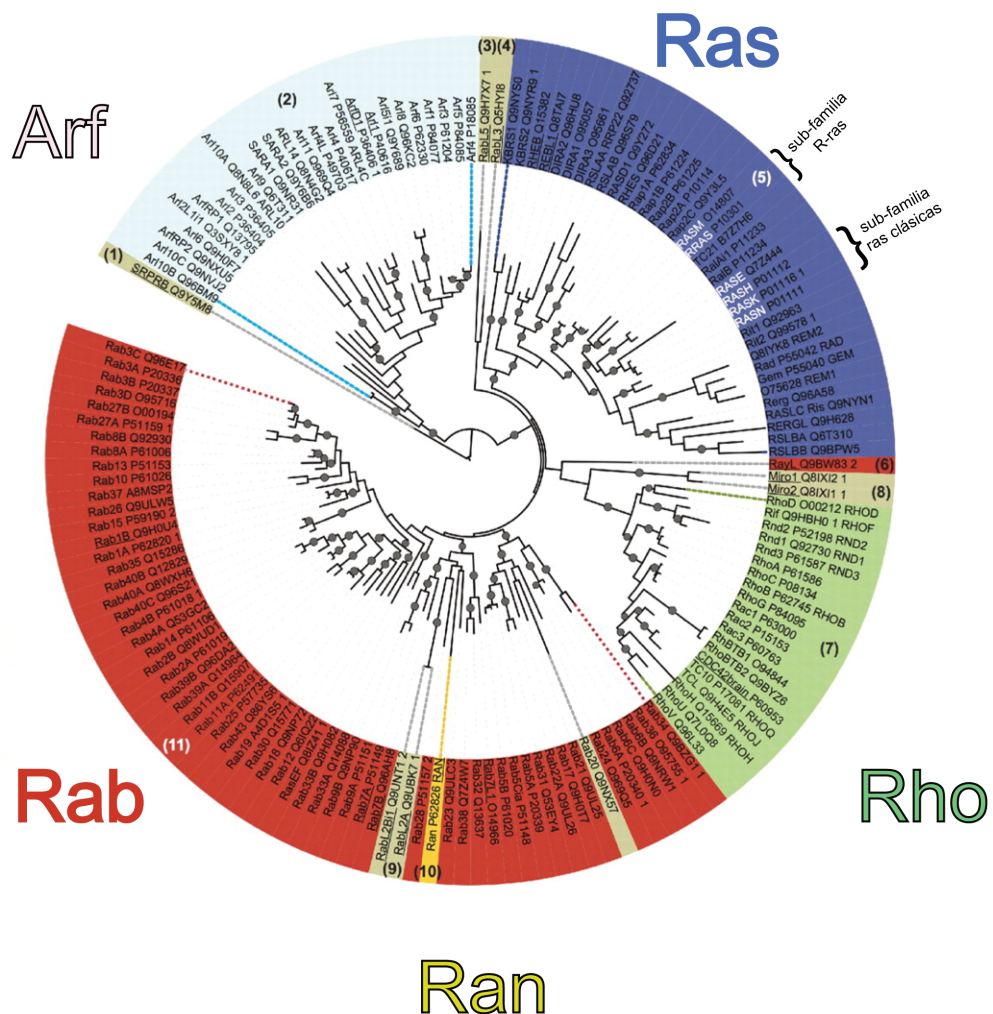
Para las medidas se empleó un fluorímetro fluostar optima (BMG Labtech) con los filtros de excitación y emisión apropiados.

# INTRODUCCIÓN

## 1. Biología de Ras

### 1.1 Superfamilia Ras de GTPasas de bajo peso molecular

En humanos, esta familia abarca aproximadamente 160 proteínas, divididas a su vez en cinco grandes grupos basados en similitudes de función y de secuencia (Figura 2 ). Participan en funciones diversas, desde señalización celular hasta proliferación, organización del citoesqueleto, tráfico vesicular, y transporte nuclear.



**Figura 2: La superfamilia Ras de GTPasas pequeñas.** Están resaltadas, por una parte, la familia de Ras “clásicas”, formada por H, K, y Nras, y por otra parte la familia de Rras. Adaptado de Rojas 2012

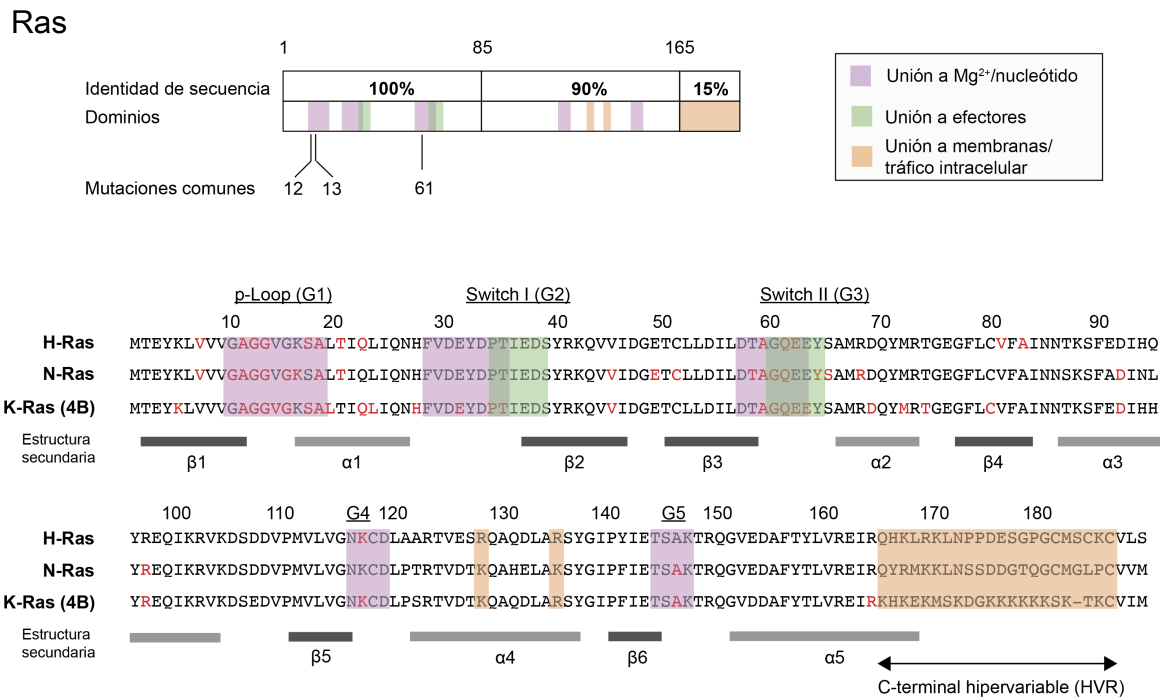
Las GTPasas de bajo peso molecular actúan como interruptores moleculares de intercambio de nucleótidos de guanina. Su ciclo oscila entre un estado activo unido a GTP y un estado inactivo unido a GDP. Poseen una alta afinidad tanto por GDP como por GTP y poseen un dominio de unión a ambos nucleótidos (dominio G), conservado en todos sus miembros (Wennerberg 2005). Estructuralmente, este dominio G está compuesto por seis láminas beta rodeadas por cinco hélices alfa (Cherfils 2013) y

hallazgo de *NRAS* (designado así por encontrarse en una línea de neuroblastoma humano) (Ireland 1989).

Ras tiene la distinción de ser el primer oncogén descrito en tumores humanos (Der 1982, Parada 1982, Santos 1982). Esta observación fructificó a partir de los descubrimientos tiempo atrás de retrovirus transformantes que causaban sarcomas en los animales infectados. A este trabajo le siguió el hallazgo del virus del sarcoma murino de Harvey (Harvey 1964) y el de Kirsten (Kirsten 1967) y su habilidad para formar sarcomas en ratas (de ahí el nombre de Ras Rat Sarcoma). Los genes virales se denominaron *HRAS* y *KRAS*. Estudios posteriores de Scolnick *et. al.*, identificaron a partir de estos genes una proteína de 21KDa asociada a membrana, que unía GDP y GTP. Este descubrimiento fue seguido del

### 1.3 Conservación de secuencia en las isoformas Ras

En la actualidad, con cientos de miembros conocidos, se designa a los tres primeros miembros de la familia Ras encontrados (que dan lugar a cuatro formas distintas) como Ras “clásicas”, esto es, a HRas, KRas4A, KRas4B y NRas. En el caso de KRas las dos isoformas se generan por *splicing* alternativo. Estas cuatro isoformas poseen entre 188 y 189 aminoácidos de longitud y comparten una homología global de secuencia de más del 80% (Figura 4 ).



**Figura 4: Comparativa de secuencias de Ras y sus dominios estructurales.** Se representan en distinto color los principales dominios, junto con su localización en la secuencia. Los aminoácidos concretos identificados en forma mutada en cáncer, están coloreados en rojo. Modificado de Prior 2012.

Los primeros 164 aminoácidos que comprenden el dominio G están muy conservados, siendo la homología aún mayor en los primeros 80 aminoácidos. Esta sección se denomina región efectora, porque es donde se unen las moléculas efectoras de Ras. La sección restante se denomina región alostérica, porque en ella residen las diferencias entre los distintos miembros de la familia Ras y es donde se ubican los residuos responsables de la interacción con la membrana plasmática (Prior 2012). Las mayores diferencias residen en los últimos 20-30 aminoácidos del extremo carboxilo-terminal (C-terminal) de la secuencia. De ahí que se denomine a esta región, la *región hipervariable* (HVR), que pertenece a la región alostérica antes mencionada. En esta región se encuentra la secuencia de aminoácidos imprescindible para dirigir Ras a la membrana plasmática (Cox 2010), aunque esto será tratado en profundidad más adelante.

Las dos variantes de KRas difieren por el uso de un cuarto exón y están designadas como 4A y 4B. El cuarto exón codifica para la región C-terminal responsable de la unión a membrana. KRas 4A puede ser modificado lipídicamente por un ácido



palmítico (palmitoilado), mientras que KRas 4B no. Datos recientes implican a KRas 4A en diversos tipos de cáncer, como el colorectal (Tsai 2015). Sin embargo, KRas4B es la isoforma más abundante.

#### 1.4 Regulación mediante GEFs y GAPs

Como se ha comentado en el apartado 1.1, la intrincada red de interacciones ente el nucleótido y la GTPasa provoca que la salida del GDP sea un proceso extremadamente lento, a lo que hay que sumar la muy alta afinidad de la GTPasa tanto por GDP como por GTP. La consecuencia de estos dos factores es una cinética de disociación extremadamente lenta, del orden de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  segundos (Wittinghofer 2011). Es por esta razón por la que el proceso debe estar regulado mediante GEFs (*Guanine nucleotide exchange factor*), para conseguir una activación efectiva de la GTPasa (Vetter 2001, Bos 2007, Cherfils 2013). Existen ocho clases de GEFs capaces de activar a Ras, incluyendo a la familia SOS (*Son of Sevenless*), RasGRF (*Ras Guanine Release Factor*) y RasGRP (*Ras Guanine Release Protein*) (Vigil 2010). Todos estos GEFs tienen en común el dominio de homología catalítico CDC25 que estimula el desalojo de GDP y el dominio REM (*Ras Exchange Motif*) en su extremo n-terminal. Ambos dominios CDC25 y REM son también necesarios para la asociación a la membrana plasmática.

La reacción de intercambio se inicia con la formación de un complejo de baja afinidad entre la GTPasa unida a GDP y el GEF que se transforma en uno de alta afinidad entre la GTPasa (libre de nucleótido) y el GEF. La unión de GTP desplaza al GEF, quedando la GTPasa activa. El proceso en detalle implica dos pasos: i) en primer lugar, el GEF desplaza el Switch I, alejándolo del sitio de unión de GDP mediante impedimento estérico, ayudándose de la flexibilidad natural de este dominio, y ii) en segundo lugar el GEF establece una serie de contactos con el Switch II creando una interfaz ente ambas proteínas que probablemente sirva para estabilizar la de por sí inestable GTPasa sin nucleótido. También contribuyen interacciones específicas de cada GEF y con cada GTPasa, de forma que puede haber un cierto grado de selectividad. Por otra parte, la consecución de estructuras tridimensionales de GTPasas asociadas a su GEF han puesto de manifiesto que el dominio CDC25 de las distintas familias de proteínas GEF difiere considerablemente en su estructura y en su aproximación a las GTPasas desde ángulos distintos (Goldberg 1998, Boriack-Sjodin 1998, Renault 2001, Itzen 2006). Sin embargo, todas usan mecanismos similares para deformar el bolsillo de unión de nucleótido de la GTPasa. Algunas mediante la inserción de un aminoácido ácido cerca del grupo fosfato, lo que contribuye a la expulsión del GDP por interacciones electrostáticas repulsivas. Otras acercan un aminoácido hidrofóbico al ión  $Mg^{2+}$  que provoca su desestabilización y por tanto la del GDP.

La actividad GTPasa de Ras es extremadamente lenta, lo que generalmente no se adecúa a la escala temporal en la que ocurren los procesos celulares. En 1987 Trahey *et. al.*, identificaron la primera proteína RasGAP: p120RasGAP (Trahey 1987). Posteriormente, se determinó tanto la estructura tridimensional de RasGAP asociada a Ras, como su mecanismo de hidrólisis (Scheffzek 1997). Más adelante, también se

identificó a la neurofibromina (NF1) como GAP de Ras en pacientes con neurofibromatosis de tipo I (Martin 1990)

RasGAP estabiliza la glutamina 61 de Ras, que, a su vez se coordina con una molécula de agua para realizar el ataque nucleofílico sobre el fosfato  $\gamma$  del GTP. De manera adicional, una arginina de la proteína GAP se coloca cerca del fosfato  $\gamma$  para neutralizar la carga negativa de este y estabilizar el estado de transición. Este mecanismo de catálisis se ha corroborado mediante estudios de mutagénesis en los que, al mutar la glutamina 61 de Ras, se anula la capacidad de hidrólisis mediada por GAP. De hecho este aminoácido se halla frecuentemente mutado en numerosos tipos de cáncer. Lo mismo ocurre con los aminoácidos 12 y 13 cuya mutación entorpece el acceso del residuo de arginina del GAP encargado de neutralizar la carga negativa del fosfato  $\gamma$ . Un proceso de catálisis similar se ha observado también en el caso de las GAPs de la familia Rho (Rittinger 1997).

#### 1.4.1 Proteínas GEF expresadas en linfocitos

Los linfocitos expresan simultáneamente tres tipos de GEFs (Figura 5), cuyos patrones de expresión solapantes dan la impresión de redundancia y de una innecesariamente compleja regulación que conecte el receptor de antígeno a la señalización de Ras. Sin embargo, los distintos defectos en desarrollo de linfocitos, hallados para cada uno de estos GEFs, ponen de manifiesto la especialización de cada una de estas familias.

La familia SOS cuenta con dos miembros: SOS1 y SOS2, que dirigen su actividad hacia Ras y Rac. Son reguladas mediante reclutamiento a la membrana plasmática donde se localiza Ras. Esta translocación es mediada por Grb2, una proteína adaptadora que posee dominios SH2 y SH3. Uno de los dos dominios SH3 se une a la secuencia de poli-prolina de SOS, mientras que el dominio SH2 lo hace a tirosinas fosforiladas de un receptor, o de proteínas asociadas al receptor (Figura 6) (Aronheim 1994).

##### SOS



##### RasGRP



##### RasGRF



**Figura 5: Organización estructural de los dominios de las tres familias de GEFs expresadas en linfocitos.** Cdc25, Dominio de homología Cdc25; DH, Dominio de homología de Dbl; HF, Dominio con plegamiento tipo histona, n-terminal; PH, Dominio de homología de Pleckstrina; PR, Dominio rico en prolina c-terminal; REM, Motivo de intercambio de Ras; EF, Dominio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ ; C1, Dominio de unión a DAG; CC-IQ, Dominio *coiled-coil* de ilimaquinona. El tamaño está representado a una escala aproximada, tomando como base SOS1, RasGRP1 y RasGRF1. Adaptado de (Jun 2013)

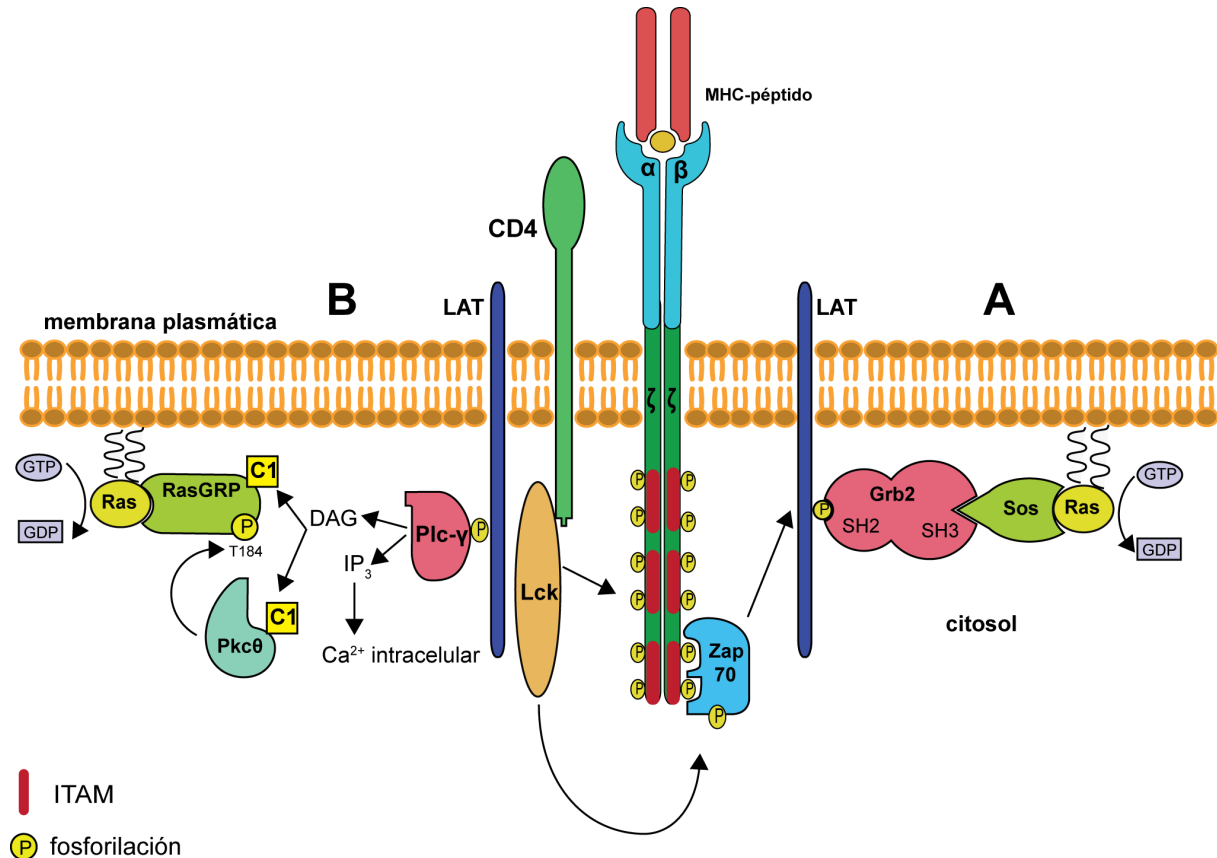


Esta translocación está regulada de manera negativa por la quinasa ERK que fosforila SOS disociándolo de Grb2 (Waters 1995). Adicionalmente, SOS es regulado también de manera alostérica, mediante Ras-GTP (Margarit 2003). Este mecanismo, exclusivo de SOS, se basa en un dominio catalítico con dos sitios de unión para Ras, uno para el intercambio GDP-GTP (CDC25) y otro adicional para la unión de Ras activo constituido por partes de los dominios REM y CDC25. La molécula de Ras-GTP que ocupa el sitio alostérico no actúa como sustrato. Su presencia estimula la actividad catalítica *in vitro* de SOS aumentándola un 75% aproximadamente, como consecuencia de una estabilización del sitio catalítico (Sondermann 2004, Freedman 2006, Vo 2016). Una prueba de este mecanismo regulador se halla en el mutante W729E de SOS1, que posee una reducida afinidad por Ras en el sitio catalítico y una baja actividad catalítica *in vitro* (Sondermann 2004). El bolsillo alostérico posee una afinidad 10 veces mayor por Ras-GTP que por Ras cargado con GDP. Esta distinción por la forma GTP otorga a SOS1 la capacidad de ser regulado según el estado de activación de Ras en la membrana plasmática y establece una retroalimentación positiva en este (Boykevisch 2006, Iversen 2014). Experimentos en los que se estudia la expresión ectópica de SOS1, *in vivo*, en células COS-1 (Boykevisch 2006, Sondermann 2004) y en células Jurkat (Roose 2007, Das 2009), también evidencian la existencia de una regulación alostérica.

La familia de RasGRPs se ha estudiado de manera más extensa en linfocitos T y B (Stone 2011) y hasta la fecha se han descubierto cuatro isoformas: RasGRP1, 2, 3 y 4. RasGRP1 está ligado a la señalización a través del TCR y BCR (Ebinu 2000, Dower 2000) y su expresión se produce en linfocitos en período de desarrollo (Kortum 2011, Priatel 2002), en cerebro (Kawasaki 1998) y en queratinocitos primarios (Rambaratsingh 2003). RasGRP3 se expresa únicamente en linfocitos B y, de manera análoga al papel que RasGRP1 juega en linfocitos T, RasGRP3 es un constituyente fundamental en la señalización a través del BCR (Coughlin 2005, Stone 2011). Ras GRP2 fue originalmente descubierta enriquecida en tejidos cerebrales y puede ser expresada en dos isoformas: una estándar, y otra larga, proveniente de un *splicing alternativo* (Stone 2011). Aunque RasGRP2 contiene el dominio catalítico característico de todos los miembros de la familia RasGRP y SOS (REM-CDC25) y estudios iniciales sugirieron que su actividad estaba enfocada a Ras, hoy se considera que RasGRP2 es un GEF para la GTPasa Rap exclusivamente (Kawasaki 1998). Otro aspecto en que RasGRP2 difiere respecto al resto de la familia RasGRP, es que su dominio C1 no une diacilglicerol (DAG) y que no se localiza en la membrana plasmática cuando se estimula la célula con análogos de DAGs (Johnson 2007). RasGRP4 fue originalmente aislada como un activador de Ras en leucemias linfoblásticas agudas (Jun 2013, Reuther 2002). Por otra parte RasGRP3 también se ha encontrado mutada en tumores diversos, como melanoma (Yang 2011) y cáncer de próstata (Yang 2010). La sobreexpresión de RasGRP1 como transgén durante el desarrollo de linfocitos T en ratones, provoca en éstos la aparición de linfomas en el timo (Klinger 2005). Además, diversos estudios han identificado el locus de RasGRP1 como un sitio habitual de integración de virus relacionados con desarrollo de cáncer en células de la sangre (Mikkers 2002, Suzuki 2002). La base molecular del efecto de estas

integraciones virales es la de que causa leucemias a través de una des-regulación del gen diana, típicamente por sobre-expresión.

Los ésteres de forbol, como el PMA o su análogo sintético DAG, son conocidos desde hace tiempo como potentes activadores de Ras. Sin embargo sólo a partir del clonaje del gen de *RasGRP1* por parte de Stone *et. al.*, que se pudo establecer la relación bioquímica entre DAG y la activación de Ras (Ebinu 1998).



**Figura 6: Modelos de activación de Ras en células T.** La estimulación del TCR conecta, a través de la proteína adaptadora LAT, la activación tanto de SOS (A) como de RasGRP (B).

En linfocitos T que reciben un estímulo a través del TCR, PLC $\gamma$ 1 se dirige a la membrana plasmática para hidrolizar PIP $_2$  a IP $_3$  y DAG (Figura 6). IP $_3$  induce la salida de Ca $^{2+}$  intracelular (Feske 2007) y el aumento de DAG provoca el reclutamiento de RasGRP1, a través de su dominio C1, a la membrana plasmática donde activa a Ras. Adicionalmente, existe otra ruta de activación de RasGRP1 y 3 a través de PKC $\theta$  (Carrasco 2004), que en RasGRP1 fosforila la treonina 184 (Figura 6), mientras que RasGRP3 es fosforilada en la treonina 133 en células B (Aiba 2004, Roose 2005).

Debido al papel predominante del DAG en la activación de RasGRP en linfocitos, tienen una especial consideración las enzimas de la familia de PLC $\gamma$  y el reciclaje y degradación que llevan a cabo las quinasas de DAG (DGKs). La supresión en ratones de PLC $\gamma$ 1 o RasGRP1 conlleva un efecto similar, que es un defecto en la selección positiva de timocitos y en la activación de ERK (Dower 2000, Fu 2010). En el otro extremo actúan las quinasas DGK, cuya función es convertir el DAG en ácido fosfatídico (PA) lo que repercute en una disminución en la activación de RasGRPs (además de otras

proteínas con dominios C1 de unión a DAG). De hecho, se ha visto que la supresión de DGK $\alpha$  y DGK $\gamma$  resulta en una incidencia mayor de linfomas de células T (Guo 2008).

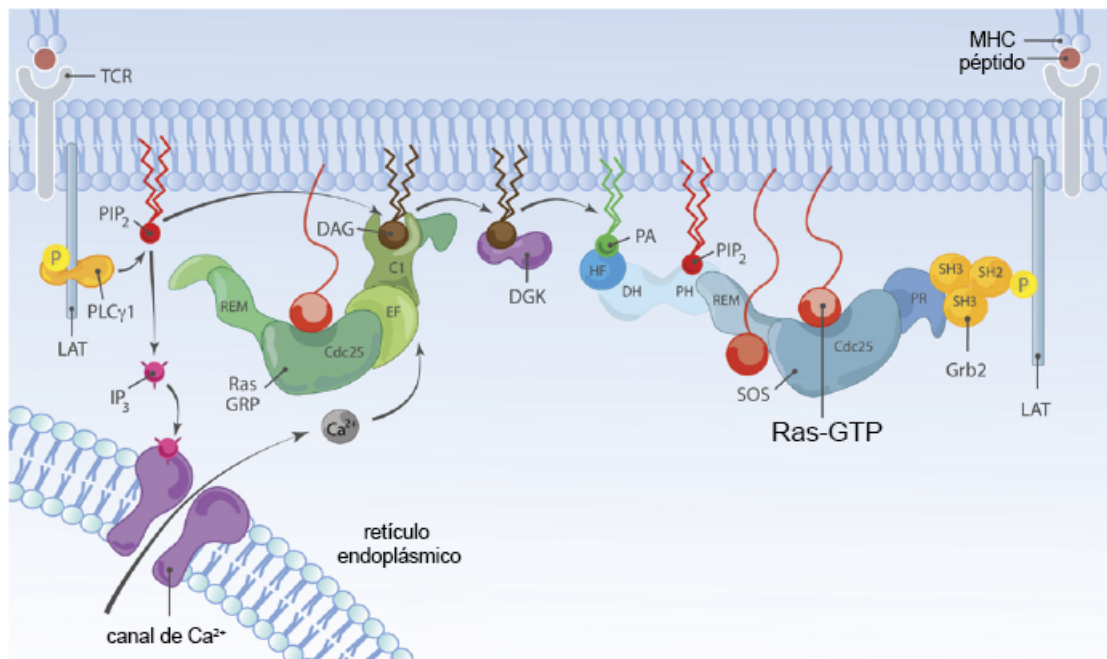
Por otra parte, rutas de señalización que no están asociadas con la producción de DAG, como por ejemplo las de aquellos receptores no activados por antígeno, también han sido involucradas en la asociación a la membrana plasmática de RasGRP. Un ejemplo de esto es el caso del receptor CXCR4 de quimioquinas en linfocitos (Golec 2013).

La familia RasGRF, más relacionada con SOS que con RasGRP, está compuesta por dos miembros: RasGRF1 y RasGRF2. Al igual que las otras dos familias, ésta también posee el dominio catalítico REM-CDC25. Sin embargo, a diferencia de SOS y RasGRP, RasGRF posee dos dominios PH, uno en su extremo n-terminal (PH1) y otro junto al dominio DH (PH2) (Figura 5). El dominio CC se sabe que participa en los procesos de oligomerización, mientras que el dominio IQ se asocia a calmodulina (Jun 2013). La expresión de RasGRF1 y RasGRF2 se localiza predominantemente en cerebro. Sin embargo, RasGRF2 pero no RasGRF1, se expresa también en linfocitos T, donde participa en rutas de señalización iniciadas por el TCR y mediadas por la GTPasa Vav y por Ca<sup>2+</sup> (Ruiz 2007).

#### 1.4.2 Sinergia entre SOS1 y RasGRP1

Cuando SOS y RasGRP se co-expresan en células T la estimulación a través del TCR puede tomar dos rutas diferentes (Figura 6), una de ellas a través de SOS y otra a través de RasGRP. Sin embargo, estudios llevados a cabo en líneas celulares y en ratones indican que RasGRP1 juega un papel más importante en la activación de la ruta de Ras→Erk, a través del TCR (Priatel 2002, Dower 2000). Otro estudio reciente también recalca que SOS1/2 podría ejercer un efecto inhibitorio para la activación de Erk a través del TCR en linfocitos periféricos humanos (Warnecke 2012). Sin embargo, este hallazgo contradice a otros resultados publicados en los que se muestra una contribución positiva de SOS en la activación de Erk a través del receptor de antígeno, tanto en líneas celulares, como en linfocitos primarios humanos y de ratón (Kortum 2011, Roose 2007, Das 2009).

La citometría de flujo ha permitido averiguar que la cantidad de Erk fosforilado en células individuales de poblaciones celulares difiere, no sólo cuantitativamente, si no cualitativamente, dependiendo del tipo de GEF que conecta la estimulación por el TCR a Ras (Das 2009). Para una activación completa de Erk se requiere, tanto la activación de SOS como la de RasGRP. En este modelo (Figura 7) la activación de RasGRP precede a la de SOS y provee a éste de Ras-GTP, que unido al sitio alostérico de SOS prepara a este para su total activación.



**Figura 7: Modelo de sinergia entre RasGRP y SOS.** Una vez activado RasGRP, mediante la acción de LAT y PLCγ1. RasGRP puede promover la activación total de SOS, mediante la provisión de Ras-GTP, que se uniría al bolsillo alostérico de SOS. Modificado de (Jun 2013).

### 1.5 Transducción de señales mediada por Ras

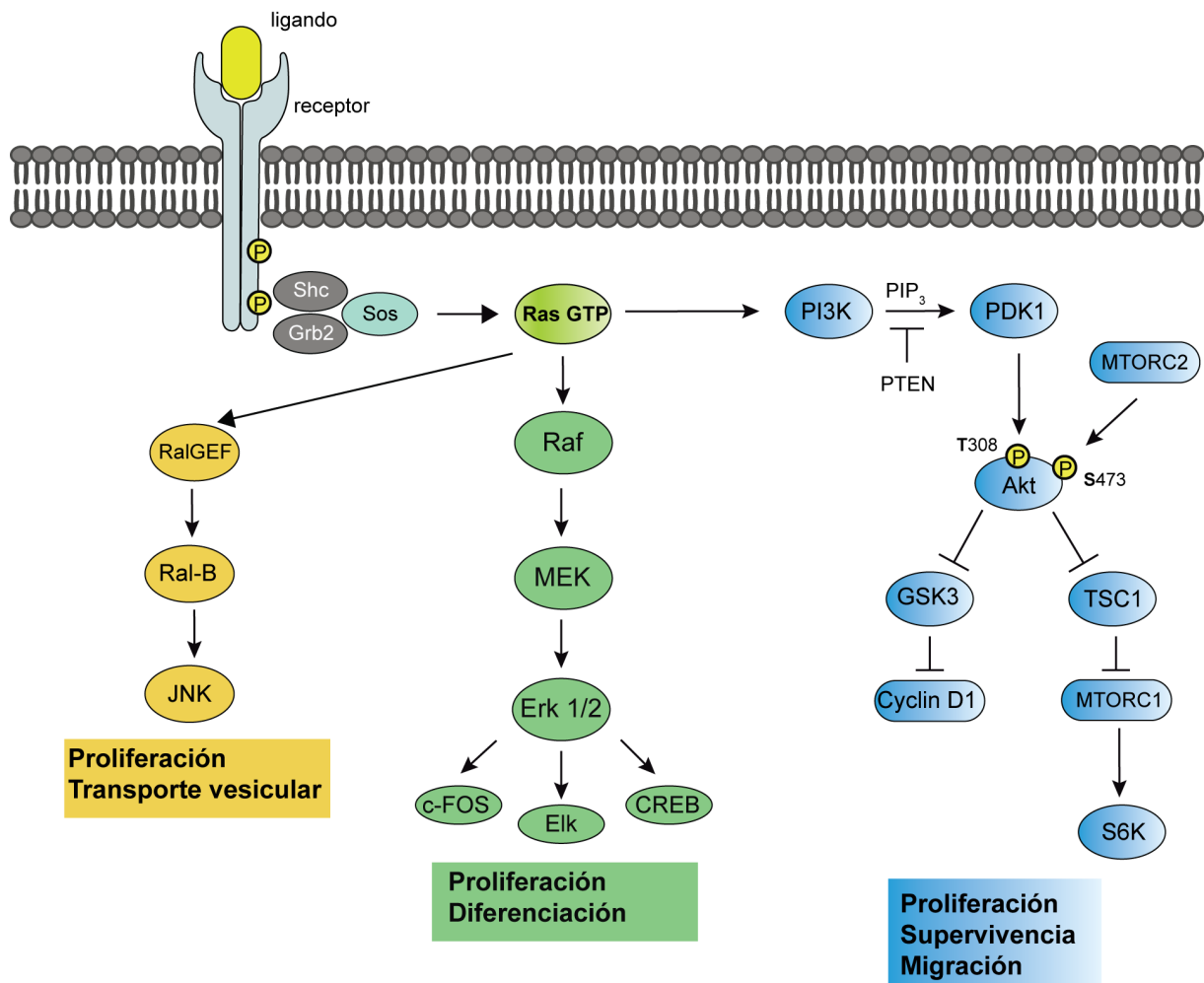
Ras activo (Ras-GTP) transmite la señal hacia el interior de la célula mediante la interacción con sus efectores. En la actualidad han sido descubiertos más de diez tipos de efectores con una gran afinidad por Ras activo, entre ellos, Raf y PI3K son los más estudiados (Figura 8). La mayor parte de los efectores de Ras comparten la misma característica estructural, conocida como Dominio de unión a Ras (RBD), a través del cual se produce la interacción con Ras activo. Aunque no existe un consenso en la secuencia de aminoácidos entre los distintos RBDs, todos ellos se pliegan siguiendo la misma topología, que es la de los dominios de tipo ubiquitina (Herrmann 2003). Este motivo estructural compartido es lo que determina el modo de interacción de los distintos efectores con Ras (Repasky 2004, Erijman 2016).

La vía de Raf→MEK→Erk es un componente importante en la ruta de señalización de MAP-quinasas (MAPK). Existen tres isoformas de Raf: a-Raf, b-Raf y c-Raf (Raf-1), que comparten secuencia y dominios estructurales (Kolch 2000). Cada una de las isoformas contiene tres regiones conservadas (CR): CR1, CR2 y CR3. CR1 consiste en el RBD y un dominio rico en cisteína (CRD), que puede unir iones de  $Zn^{2+}$ . CR2 es un dominio rico en serinas y treoninas que se une a proteínas reguladoras del tipo 14-3-3. CR3 es el dominio quinasa catalítico, que se localiza en el extremo c-terminal de la proteína (Roskoski 2010). La isoforma c-Raf es la proteína efectora de Ras más estudiada, habiendo sido identificada por vez primera en un retrovirus (3611-MSV) causante de fibrosarcomas (Lavoie 2015). Ras activo interacciona directamente con Raf a través del RBD y lo recluta a la membrana plasmática. Ensayos de doble-híbrido y de unión *in-vitro* confirmaron que la región de unión a Ras la conforma el segmento de aminoácidos del 55-131 en c-Raf (Vojtek 1993, Chuang 1994, Ghosh 1994;). A esto sigue

una serie de fosforilaciones que activan el sitio catalítico de Raf (Dickson 1992, Koide 1993, Lavoie 2015). Una vez activo, Raf procede a fosforilar y activar las quinasas MAP (MEK 1/2) (Kyriakis 1992). MEK activo fosforila a su vez, y activa, a las quinasas reguladas extracelularmente (ERK 1/2) (Gallego 1992). Estas a su vez fosforilan proteínas citosólicas como S6 quinasa, o pueden trasladarse al núcleo y activar factores de transcripción como Elk-1, c-Fos y c-Jun, que regulan la proliferación y ciclo celulares (Figura 8).

Experimentos de mutagénesis dirigida han puesto de manifiesto la importancia de los aminoácidos del Switch I: E31, T35 y E37 en la capacidad de asociación con el RBD de Raf, lo que sugiere que Raf interacciona directamente con esta región de Ras (Gohlke 2003). Sin embargo, otra mutación en el aminoácido 168 (C168S) permitió averiguar un papel para la región CRD (aminoácidos 139-184) en la interacción con Ras (Zhang 1993, Brtva 1995).

Mediciones directas *in vitro*, de la afinidad a los segmentos individuales de RafRBD y RafCRD muestran que las mutaciones T35A y E37G en la región Switch I de



**Figura 8: Representación simplificada de las principales vías de señalización de Ras.** En este dibujo, un ligando (factor de crecimiento) activa un receptor tirosina-quinasa, que a su vez, tras una serie de proteínas adaptadoras, activa a Ras. Ras une y activa a sus correspondientes efectores. En este caso únicamente están representados los más estudiados: Ral, Raf y PI3K.

HRas impiden la interacción de este con RafRBD, pero no con RafCRD (Drugan 1996). Al contrario, las mutaciones G60A y Y64W en la región Switch II de Ras impiden la asociación con RafCRD, pero no tienen ningún efecto con RafRBD (Drugan 1996). Por otra parte, las mutaciones N26G y V45E en Ras también provocan la pérdida de asociación con el RafCRD, mientras que no tiene consecuencias para la asociación con RafRBD (Hu 1995, Tamada 1997). Respecto a la región del CRD que se asocia con Ras, además de la importancia del residuo C168, se halló que un péptido con la secuencia *RKTFLKLA* correspondiente a los aminoácidos 143-150 impedía la unión de Ras a Raf1, así como la activación de la vía de MAPK, en un ensayo de competición *in-vitro* con Ras no farnesilado (Clark 1996). Un estudio posterior más detallado identificó mediante mutagénesis dirigida, basada en el grado de exposición al medio de los residuos del CRD, nuevos aminoácidos importantes para la asociación a Ras (Daub 1998, Winkler 1998). En cuanto a la dependencia de unión del CRD, en función de que Ras esté cargado con GDP o GTP, estudios *in-vitro* con Ras no farnesilado muestran que se trata de una unión GTP-dependiente (Brtnva 1995), mientras que en Ras farnesilado esta unión se produce indistintamente de la carga de nucleótido (Williams 2000) y con una afinidad menor a la forma farnesilada. En este mismo trabajo también se identifican dos residuos del CRD de Raf1, 149 y 151, como necesarios para la interacción con Ras (Williams 2000).

Los datos de afinidad arrojan un valor de 20 $\mu$ M para la unión de HRas al RafCRD, mientras que para el RafRBD es mucho mayor, de 18nM (Thapar 2004). Aunque las mutaciones G60A y Y64W no impiden la unión al RBD, si que anulan la capacidad transformante y oncogénica en un mutante de HRas constitutivamente activo (Hu 1995, Williams 2000, Luo 1997), de modo que tanto el RBD como el CRD de Raf son necesarios para promover la asociación de Raf con la PM (Bondeva 2002). Sin embargo, todavía no se ha conseguido resolver la estructura tridimensional del dominio CRD unido a Ras, por lo que el mecanismo mediante el cual ambos dominios se disponen para activar el dominio quinasa de Raf sigue pendiente de elucidar. Si se ha obtenido, mediante NMR, la estructura del CRD aislado (Mott 1996), que se pliega de manera similar al CRD de la quinasa PKC $\delta$ .

La enzima fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) es el segundo efector más estudiado por detrás de Raf (Rodriguez-Viciano 1994). Existen tres clases de PI3quinasas de las cuales la clase I es la mejor descrita. Las PI3quinasas de tipo I (subdivididas a su vez en IA y IB) son heterodímeros consistentes en una subunidad catalítica (P110 $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (IB)) y otra subunidad reguladora (p85 para IA; p84 y p101 para IB) (Castellano 2011, Simons 1997, Simons 2011, Vanhaesebroeck 2010). Su función catalítica es la de convertir fosfatilinositol (4,5)-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) a fosfatilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> a su vez, activa PDK1 que fosforila a la quinasa Akt (PKB). Dependiendo del contexto celular, Akt juega un papel en un surtido de rutas de señalización, incluyendo, crecimiento celular, supervivencia y migración (Figura 8) (Wong 2012 Yuan 2008). La señalización de Akt a través del complejo TSC conduce a la activación de la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR), que regula principalmente la síntesis de proteínas y el metabolismo.

El papel individual que juega cada isotipo de PI3K de tipo I ha sido descrito en células del sistema inmune mediante el uso de ratones deficientes para PI3K (*Knock-*

*Out*, KO), o utilizando inhibidores (Okkenhaug 2013). Las isoformas p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  se expresan de manera ubicua, en la mayor parte de tipos celulares, mientras que en las isoformas p110 $\delta$  y p110 $\gamma$  su expresión está limitada a células del sistema inmune (Fung-Leung 2011, Vanhaesebroeck 2010). En cuanto a p110 $\gamma$ , es fácil deducir por qué desempeña un papel fundamental en distintos aspectos celulares, dado que es capaz de utilizar dos isoformas diferentes de subunidad reguladora, diferentes de las utilizadas por el resto de PI3Ks de clase I: p84 y p101. Esto hace de p110 $\gamma$  una proteína clave en la señalización a través de receptores de quimioquinas y la selección tímica en el sistema inmune (Andrews 2007, Janas 2011), aunque también es activada en células T en respuesta a la estimulación del receptor de células T (TCR) (Alcázar 2007).

Por otra parte, p110 $\delta$  puede ser activada también por receptores de quimioquinas, como en el caso de células *Natural Killer* (NK), o células B (Saudemont 2009, Reif 2004) aunque no es lo habitual, ya que esta isoforma no suele ser activada de manera eficaz por este tipo de receptores, como lo son las isoformas p110 $\gamma$  y p110 $\beta$ .

*PI3KCA*, el gen para la isoforma p110 $\alpha$ , es uno de los oncogenes más frecuentemente mutados en tumores humanos (Samuels 2010). Además, la habilidad de Ras para transformar células depende en parte de su habilidad para activar esta isoforma de PI3K (Castellano 2011, Gupta 2007, Castellano 2013).

La mayor diversidad en cuanto a la secuencia de aminoácidos, entre las distintas isoformas de p110 de clase I, se encuentra en su RBD (Foukas 2010). El RBD de p110 $\alpha$  y p110 $\delta$  puede unirse a la mayor parte de los miembros de la familia Ras, incluyendo a H, K, y NRas (Rodríguez-Viciano 2004), mientras que p110 $\beta$  muestra una asociación considerablemente menor, en ensayos *in vitro*. Por otro lado RRas y RRas2, son los únicos de la familia Ras capaces de activar la isoforma p110 $\delta$  (Rodríguez-Viciano 2004).

En células precursoras hematopoyéticas y en células pre-B inmaduras, p110 $\alpha$  y p110 $\delta$  actúan de manera redundante (Ramadani 2010, Foukas 2010). Sin embargo, la eliminación de p110 $\alpha$  tiene un impacto mínimo en la fosforilación de Akt en respuesta a la estimulación del receptor de células B (BCR), mientras que la inhibición de p110 $\delta$  abole casi completamente la fosforilación de Akt en células B maduras cuando ambas isoformas se expresan (Okkenhaug 2002, Ramadani 2010). De manera similar, p110 $\delta$  es la isoforma activada de manera mayoritaria en células T, macrófagos y células dendríticas (Okkenhaug 2007).

La tercera vía de señalización más importante en la que participa Ras, es la de RalGDS (Figura 8) (Neel 2011). RalGDS es uno de los varios GEFs conocidos que actúan sobre las GTPasas RalA y RalB (Wolthuis 1999). Ral interacciona con sus efectores para la regulación de procesos endocíticos, exocíticos, de remodelación de actina y de proliferación celular (Hofer 1994). En 1994, mediante un ensayo de doble híbrido, diversos grupos independientes encontraron que RalGDS es un efector putativo de Ras que interacciona con Ras cargado con GTP (Hofer 1994, Kikuchi 1994). Además, se observó que el RBD RalGDS compite con el RBD de Raf, lo que sugiere que ambos comparten una misma interfaz de unión a Ras. Estudios mutacionales de HRas en la



región Switch I muestran que el intercambio E37G permite conservar la unión a RalGDS, pero no a Raf o PI3K. Mientras que la mutación T35S abole la unión de HRas con RalGDS aunque sigue permitiendo la interacción con Raf (White 1995, Okazaki 1997, Khosravi-Far 1996). Con estos resultados, se precisó la función de RalGDS como un efector de Ras en crecimiento celular estimulado por AMP-cíclico (cAMP) (Miller 1997). Posteriormente, se comprobó que ratones deficientes para RalGDS presentaban una menor incidencia de tumores en un modelo de cáncer de piel inducido por HRas oncogénico (Gonzalez-Garcia 2005).

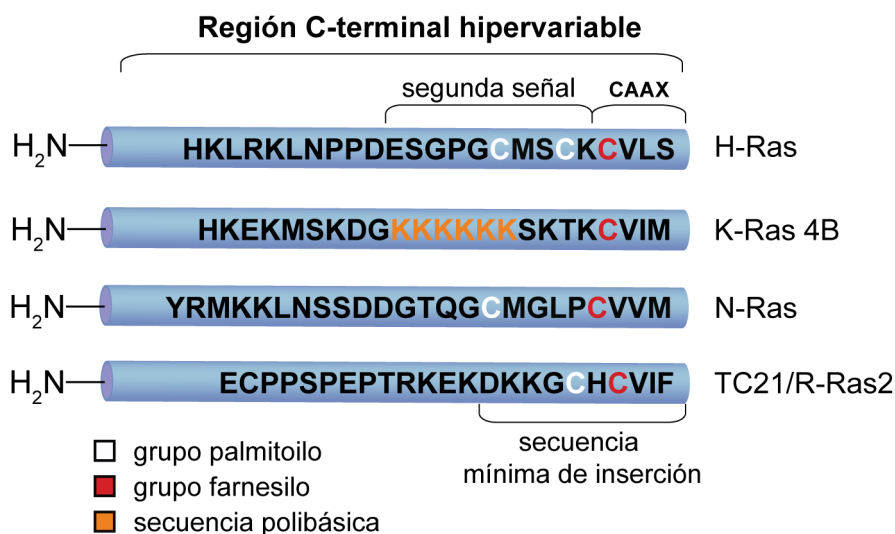
Al igual que ocurre con el CRD de Raf, que se une al Switch II de Ras, la mutagénesis G60A en HRas anula la interacción con el RBD de RalGDS, como consecuencia del impacto de esta mutación en la conformación del Switch II (Hwang 1996).

## 2. Modificaciones post-traduccionales de Ras

El gran número de funciones biológicas que realiza la familia Ras depende en gran medida de la especificidad en la señalización, que a su vez depende en parte de su localización, influida por un conjunto de modificaciones post-traduccionales de carácter lipídico. Prácticamente todos los miembros de las familias Ras, Rab y Rho, experimentan distintas modificaciones en su extremo c-terminal que modulan la localización subcelular, así como interacciones con proteínas reguladoras, efectores y chaperonas.

### 2.1 Síntesis, procesamiento y tráfico a la membrana plasmática

Ras es sintetizado en el citosol y posteriormente es trasladado a las membranas de distintos orgánulos intracelulares mediante una serie de procesos que modifican su región hipervariable (Figura 9).



**Figura 9: Modificaciones post-traduccionales de Ras.** Se muestra la secuencia HVR de cuatro isoformas de Ras. Esta región contiene los aminoácidos necesarios para la asociación a la membrana plasmática.



Los últimos 24-25 aminoácidos de Ras proporcionan la información necesaria requerida para un correcto anclaje a la membrana plasmática (Figura 9). Esta región comprende, por una parte, la llamada “caja CAAX”, que dicta el proceso de prenilación, y los pasos subsiguientes. Inmediatamente antes se encuentra la secuencia de aminoácidos, denominada “segunda señal”, que puede ser modificada de formas distintas: bien por un grupo palmitoilo en las cisteínas de color blanco (Figura 9), por una sección de aminoácidos básicos (Figura 9) (KRas4B en color naranja), o por otros tipos de modificaciones no lipídicas que se comentarán más adelante. La secuencia mínima de inserción (Figura 9) hace referencia a los aminoácidos mínimos imprescindibles para la asociación a la membrana plasmática (Gysin 2011).

El primer paso en la secuencia de modificación es la adición, de carácter irreversible, de un grupo farnesilo (isoprenoide de quince carbonos), catalizada por la enzima Farnesil transferasa (FTasa) (Figura 10). Este grupo farnesilo se acopla al residuo de cisteína de la secuencia CAAX (en donde C denota cisteína, X cualquier aminoácido y A denota un aminoácido alifático). El aminoácido “X” de la caja CAAX dicta el tipo de grupo prenilo con el que va a ser modificada la GTPasa. Si es una Leucina (L), la modificación será por un grupo geranil-geranilo, mientras que si es una serina (S), lo será por un grupo farnesilo (Reid 2004).

En presencia de inhibidores de FTasas, KRas4A y NRas pueden ser modificados con otro grupo prenilo, el geranil-geranilo, por medio de la enzima geranil-geranil transferasa I (Whyte 1997, Konstantinopoulos 2007) (HRas sólo es farnesilado). Estos dos isoprenoides ofrecen una débil aunque suficiente asociación a la membrana y sirven como cimientto para las siguientes rondas de modificaciones. Ras prenilado es dirigido al retículo endoplásmico (RE) donde el extremo -AAX es cortado proteolíticamente por la metaloproteasa RCE1 (Figura 10). A esto le sigue la carboximetilación de la cisteína prenilada por la enzima ICMT también en el RE (Gutierrez 1989). Por otra parte, RasGRF2 es capaz de distinguir entre grupos farnesilo y geranil-geranilo, pudiendo actuar sólo cuando la GTPasa está farnesilada (Gotoh 2001, Reid 2004). En el caso de RRas, que es geranil-geranilado, RasGRF2 no actúa sobre él. RRas2 puede ser tanto farnesilado como geranil-geranilado (Carboni 1995, Roskoski 1998). RRas2 sólo se une a RasGRF2 cuando se muta la Fenilalanina 204 a Leucina (F204L) de la caja CAAX (Calvo 2009).

Las GTPasas Ras pueden requerir de otro paso de maduración (segunda señal) para aumentar su afinidad por la membrana plasmática y poder ser dirigidos hacia esta (Hancock 1990). En el caso de HRas, NRas y KRas4A, esta segunda señal consiste en una palmitoilación de un residuo de cisteína, mientras que para KRas4B es una secuencia de aminoácidos básicos, en concreto de lisinas (K) ( Figura 9). La palmitoilación es una modificación reversible llevada a cabo por las enzimas Palmitoil-Transferasas (PATs) presentes en el Golgi. Las enzimas PAT: DHHC9 y GCP16 (Figura 10) trabajan conjuntamente y actúan selectivamente sobre HRas y NRas (Swarthout 2005). HRas es palmitoilado en dos cisteínas (181 y 184), KRas 4A en la cisteína 180, y NRas en la cisteína 181 (Laude 2008) (Figura 9). El acoplamiento de un grupo palmitoilo junto con la modificación por farnesilación, incrementa en más de cien veces la afinidad de Ras por la membrana plasmática (Shahinian 1995).

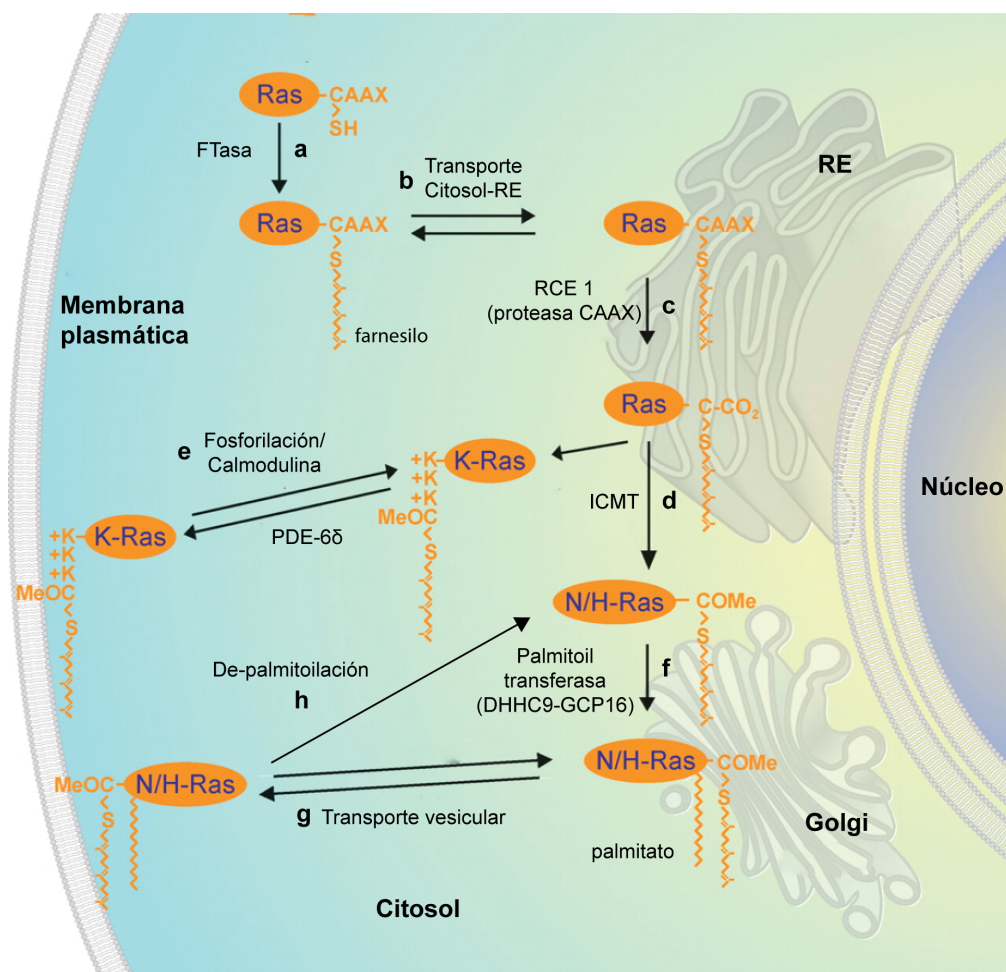


Figura 10: Procesamiento y tráfico intracelulares de Ras. Modificado de (Ahearn 2012)

KRas4B, al contrario que HRas y NRas, no es palmitoilado. En cambio posee una secuencia polibásica de lisinas que le provee de interacciones electrostáticas con los fosfolípidos cargados de la cara interna de la membrana plasmática (Hancock 1989, Hancock 1990). Ni la farnesilación, ni la secuencia polibásica por sí solas son capaces de proporcionar a KRas4B una unión estable a la membrana plasmática, sólo ambas

otorgan la afinidad requerida. KRas4B no se dirige al Golgi, ya que no se palmitoila, si no que se dirige de manera más directa a la membrana plasmática (Schmick 2014) (Figura 10). Datos recientes muestran que Kras4A es único, en cuanto a que utiliza un mecanismo híbrido de translocación a la membrana plasmática. Este consta de una cisteína que es palmitoilada, flanqueada por dos secciones de aminoácidos básicos (Tsai 2015). Estos datos también revelan que estos motivos, por separado, son suficientes para dirigir a Kras4A a la membrana.

## 2.2 Ciclo de asociación-disociación de Ras en la membrana plasmática

La regulación del tráfico intracelular de Ras y su asociación a membranas de es un proceso no del todo comprendido (Figura 10). La asociación de Ras con las múltiples membranas intracelulares es un proceso dinámico facilitado por interacciones reversibles de aminoácidos básicos y grupos palmitoilo. Esto se consigue por medio de un ciclo de palmitoilación-despalmitoilación que comienza con la adición de grupo palmitoilo en el Golgi, y su posterior trasladado a la membrana plasmática mediante un transporte vesicular. Seguidamente tiene lugar la despalmitoilación y el regreso al Golgi donde interaccionará de nuevo con las enzimas PAT para una nueva ronda de palmitoilación (Figura 10). Trabajos recientes han demostrado que la proteína acil tioesterasa (APT 1/2) es responsable de la despalmitoilación, tanto de HRas como de NRas. APT1 rompe el enlace tioéster dejando a HRas con el grupo farnesilo únicamente (Dekker 2010). Esta despalmitoilación hace que Ras se solubilice y pase al citosol celular, dando paso a su posterior re-palmitoilación en el Golgi. Este ciclo es crítico para asegurar una distribución apropiada de Ras palmitoilado entre la membrana plasmática y el Golgi.

La distribución de los distintos Ras entre los orgánulos celulares está regulada también por la proteína PDE6 $\delta$  (fosfodiesterasa  $\delta$  de bastones de la retina) que une grupos prenilo y actúa como un factor que solubiliza proteínas Ras, modulando de este modo su actividad. PDE6 $\delta$  asegura una correcta localización intracelular de proteínas farnesiladas, tanto de la familia Ras como de otras GTPasas (Figura 10) (Chandra 2011). La actividad de PDE6 $\delta$  está regulada por la interacción alostérica de la proteína Arl 2/3. La unión de Arl2 activo (unido a GTP) a PDE6 $\delta$  provoca la salida de Ras farnesilado del bolsillo de unión de PDE6 $\delta$  (Ismail 2011). Adicionalmente, se ha descubierto recientemente que la despalmitoilación de HRas está estimulada por la actividad prolil-isomerasa de la proteína de 12KDa asociada a FK506 (FKBP12) (Ahearn 2011). FKBP12 cataliza la isomerización cis-trans del enlace entre los aminoácidos 178 y 179 (glicina-prolina) de HRas, acelerando su despalmitoilación (Figura 11).

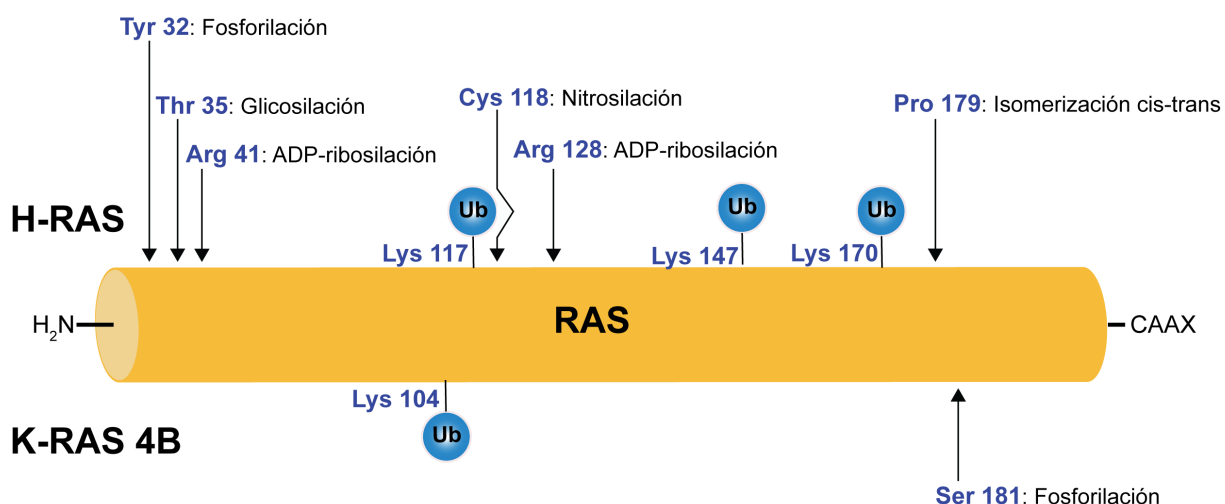
Existen otras modificaciones que regulan el tráfico y la señalización de Ras. Por ejemplo, la proteína quinasa C (PKC) fosforila la serina 181 en KRas4B, un proceso antagónico a la unión de calmodulina por ésta, lo que interfiere en la interacción electrostática del HVR con la membrana plasmática (Villalonga 2001, Villalonga 2002). Ésto provoca un cambio en la localización de KRas4B, de la membrana plasmática al citosol y la mitocondria, donde KRas4B desencadena un proceso de apoptosis

dependiente de Bcl-XL (Bivona 2006), lo que convierte a KRas4B en una proteína supresora del crecimiento celular (Sung 2013). Sin embargo, otros estudios indican que la fosforilación de KRas4B, es necesaria para mantener sus propiedades oncogénicas (Alvarez-Moya 2010, Barcelo 2014).

Por otra parte, las cisteínas 181 y 184 de HRas pueden ser modificadas por compuestos lipídicos como las prostaglandinas ciclopentenonas (mono y bi) y otros grupos reactivos como el fenil-óxido de arsénico (PAO) cuya unión covalente activa vías de señalización propias de Hras. La unión de estos compuestos abole la modificación por palmitoilación, modificando su actividad y unión a membranas (Oeste 2011).

### 2.3 Modificaciones no lipídicas

Además de las modificaciones lipídicas, imprescindibles para que Ras se pueda dirigir a la membrana plasmática, este también puede ser modificado de forma regulada tras la activación de determinados receptores, por el estado redox celular, o tras la infección por patógenos microbianos. Las condiciones en las que se producen estas modificaciones, así como su relevancia fisiológica, están empezando a ser dilucidadas. La mayor parte de estas modificaciones se resumen en la Figura 11.



**Figura 11: Modificaciones condicionales de Ras.** Todas las modificaciones condicionales conocidas para HRas (arriba) y KRas4B (abajo) se muestran junto a la secuencia de aminoácidos. Todas estas modificaciones tienen consecuencias para el tráfico celular y la señalización de Ras. Modificado de Ahearn 2012

Dos de estas modificaciones ya han sido comentadas en el apartado anterior: la isomerización cis-trans en la prolina 179 de HRas y la fosforilación en la serina 181 de KRas4B. Por otra parte la ubiquitinación (mono y doble) se ha descubierto recientemente en distintos residuos de lisina de HRas, KRas y NRas. Aunque no todos los residuos se han comprobado mediante estudios de mutagénesis, algunas lisinas han sido identificadas como candidatos (Jura 2006) (Figura 11). En KRas la ubiquitinación de la lisina 147 provoca un aumento en la carga de GTP y en el caso de ocurrir en el mutante oncogénico, G12V, incrementa la afinidad de KRas por los efectores c-Raf y PI3K (Sasaki 2011). En un estudio posterior sobre HRas se observó que la monoubiquitinación en la

lisina 147 tiene un importante efecto de reducción de la actividad GTPasa mediada por GAP. Sin embargo, no tiene efecto sobre la asociación de GEFs, o sobre la afinidad de Ras por el nucleótido (Baker 2013). La lisina 104 (K104) está en la hélice 3 de Ras cerca del sitio de unión de GEFs, por lo que se prevé que su mutación pueda dar lugar a alteraciones en la actividad del GEF. Por otra parte, la K104 también ha sido hallada acetilada, modificación que impide precisamente la regulación de Ras a través de GEFs cuando se mimetiza a través del mutante K104Q (Yang 2012). En ensayos posteriores se comprobó que son las enzimas de-acetiladas HDAC6 y SIRT2 las que regulan el estado de acetilación de Kras4B (Yang 2013). Sin embargo, en un experimento en el que se modificó químicamente con ubiquitina la K104 en KRas, no se observó ningún efecto sobre el intercambio mediado por SOS1. *In vitro*, la mono-ubiquitinación en la K117 de HRas promueve el intercambio de GDP por GTP (Baker 2013); siendo el residuo más frecuentemente ubiquitinado en células 293T. En este mismo estudio también se comprobó que, al contrario que las ubiquitinaciones en las lisinas K117 y K147, la ubiquitinación de K104 no tiene ningún efecto *in-vitro* (Baker 2013).

Otro tipo de modificación, la S-nitrosilación, se produce en la cisteína 118, que está conservada en la familia de Ras clásicas (no así en RRas y RRas2), siendo la cisteína más expuesta en estas GTPasas. Este residuo puede ser nitrosilado cuando se expone a óxido nítrico (NO) (Lander 1996) lo que no altera la estructura de la proteína pero aumenta el intercambio de GDP por GTP, desembocando en una mayor activación de Ras (Lander 1995, Williams 2003). Otro estudio posterior con ratones apunta a una menor tumorigénesis cuando *KRAS* tiene la mutación C118S. En este trabajo se trató a los ratones con uretano para inducir tumores con KRas mutado en el pulmón. Los ratones con KRas mutado a C118S mostraban una menor tumorigénesis (Huang 2014).

En células T la enzima óxido nítrico sintasa del endotelio (eNOS) regula positivamente la activación de Ras cuando la eNOS es estimulada a través del TCR. Esta regulación, que se produce en el Golgi, es exclusiva de NRas y contribuye a la apoptosis mediada por antígeno (Ibiza 2008). Otra modificación que puede sufrir Ras es la fosforilación en la tirosina 32 (Y32) por parte de la quinasa Src. Este evento, que se produce en la forma cargada con GTP, está relacionado con una mayor asociación a proteínas GAP y por tanto a una mayor tasa de hidrólisis (Bunda 2014).

Ras es también una diana particularmente atractiva para ciertos factores de virulencia bacterianos que modifican proteínas eucariotas que participan en procesos de señalización. Muchas de estas enzimas tienen como blanco la familia Rho de GTPasas, que regulan procesos de remodelación del citoesqueleto (Aktories 2000). Sin embargo, también las hay para la familia Ras, por ejemplo, la exoenzima S de *Pseudomonas aeruginosa*, una ADP-ribosil transferasa que modifica Ras en los residuos de arginina 41 y 128 provocando una deficiente tasa de intercambio de nucleótido (Ganesan 1999). Por otra parte, una toxina producida por la bacteria *Clostridium sordellii*, una glucosil-transferasa que usa UDP-glucosa como sustrato, glucosila Ras en el residuo 35 provocando una inhibición en la señalización de la vía de las MAPK (Herrmann 1998).

Existen otras dos modificaciones que no están reflejadas en la Figura 11. Una de ellas es la fosforilación en la tirosina 137 en HRas (Ting 2015) por la quinasa ABL

(*Abelson tyrosine-protein kinase*). Esta fosforilación, que se estudió en células 293T, tiene como consecuencia la alteración de manera alostérica de la unión a sus efectores, favoreciéndola y aumentando la señalización. La otra modificación tiene que ver con la fosforilación de HRas en residuos de treonina 144 y 148 por GSK3 y su posterior ubiquitinación (Jeong 2012). Esta fosforilación promueve la degradación de Hras en el proteasoma tras la unión de la ubiquitin-ligasa  $\beta$ -TrCP.

## 2.4 Nanoclusters y dimerización

La primera evidencia de la asociación de Ras a balsas lipídicas proviene de experimentos de fraccionamiento celular (Prior 2001, Roy 1999), y posteriormente de la visualización directa de Ras en la bicapa lipídica de la membrana plasmática mediante microscopía electrónica (Prior 2003). Estos resultados mostraron que aproximadamente el 44% de Ras en la membrana plasmática está distribuido en dominios llamados “nanoclusters”, mientras que el resto existe como monómeros (Plowman 2005, Prior 2003). Cada nanocluster tiene un diámetro de 12-20 nanómetros y contiene 6-7 moléculas de Ras. Existe incluso una segregación de cada isoforma Ras en función del nucleótido unido, de forma que los nanoclusters de Ras-GTP y de Ras-GDP son distintos y no se solapan. Esta organización altamente dinámica es muy similar a la de las proteínas con anclajes de tipo GPI (Sharma 2004), que se disponen en nanoclusters de tamaño menor a 5 nanómetros, con cuatro proteínas como máximo (Mayor 2004, Sengupta 2011, van Zanten 2010)

Los nanoclusters de Ras activo funcionan como sitios de reclutamiento de efectores de Ras, como PI3K o Raf, a la membrana plasmática (Tian 2007). Su vida media es de sólo 0.1-1 segundos, lo que las convierte en estructuras muy dinámicas que están constantemente ensamblándose y desmontándose (Hancock 2005, Hibino 2003, Murakoshi 2004). La formación de nanoclusters es esencial para la transducción de señales de Ras; ya que su disminución implica también una bajada en los niveles de señalización mediados por Ras. Además, la dinámica espacio-temporal de estos nanoclusters es esencial para la fidelidad en la señalización (Kholodenko 2010). Los nanoclusters de Ras-GTP funcionan como un interruptor digital que proporciona una cantidad fija de Erk activo en el citosol celular (Harding 2008), permitiendo establecer con gran precisión la transmisión de señales a través de la membrana plasmática. Dependiendo de la cantidad del estímulo utilizado, por ejemplo de EGF, se forma un menor o mayor número de nanoclusters, que a su vez producen la señal correspondiente de manera digital, generando siempre la máxima producción de Erk fosforilado durante su ciclo de funcionamiento. La cantidad final de Erk fosforilado correspondería a la suma de todas las contribuciones individuales de cada nanocluster (Harding 2008, Tian 2007, Zhou 2015).

En cuanto a la composición lipídica de los nanoclusters de Ras, la primera evidencia de la contribución del colesterol se obtuvo en experimentos en los que se eliminó el colesterol de la membrana plasmática con metil  $\beta$ -ciclodextrina (MBCD) (Prior 2003). Notablemente, estos datos indican HRas-GDP forma nanoclusters dependientes de colesterol mientras que los de HRas-GTP son independientes (Prior



2003). Por otro lado, experimentos de microscopía electrónica y FRET mostraron que la MBCD rompe la segregación lateral de HRas-GDP y HRas-GTP, mezclando ambas formas y dificultando la capacidad de Hras para activar rutas de señalización (Ariotti 2014, Roy 1999). Al contrario que Hras, los nanoclusters de NRas-GTP, pero no los de NRas-GDP, dependen de colesterol (Roy 2005). Por otra parte, los nanoclusters de KRas-GTP y GDP son independientes de colesterol (Plowman 2005).

Otro componente fundamental que sirve de andamio a los nanoclusters son las galectinas, proteínas de tipo lectina que unen  $\beta$ -galactósidos que están involucradas en diversos procesos celulares, como la homeostasis y la apoptosis, así como en diversas patologías como inflamación, diabetes y cáncer. (Astorgues-Xerri 2014) La galectina-1 (Gal-1) fue la primera en que se descubrió la interacción con HRas oncogénico (G12V) y que incrementa la actividad de Ras, colaborando en procesos de transformación celular (Paz 2001). Ahora se sabe que Gal-1 es un componente integral en los nanoclusters de HRas y que su sobreexpresión aumenta la formación de nanoclusters de HRas G12V (Belanis 2008). Además, la activación de HRas incrementa la co-localización de Gal-1 con HRas en la membrana plasmática, lo que sugiere que Gal-1 podría modular la señalización de HRas (Rotblat 2010). Sin embargo, en un trabajo reciente se ha descubierto que Gal-1 no interacciona directamente con HRas activo, si no con sus efectores, en especial Raf (a través de su RBD) (Blazevits 2016). Según este modelo, la dimerización de Gal-1 estabiliza a Raf que, a su vez promovería la dimerización de HRas.

Por otro lado, la galectina-3 (Gal-3) está específicamente asociada a KRas activo (Shalom-Feuerstein 2008), siendo Gal-3 reclutada a la membrana plasmática por KRas. La asociación de KRas y Gal-3 promueve la activación de PI3K y c-Raf, aunque reduce la fosforilación de Erk, mediada por EGF. La galectina-1 al contrario de lo que ocurre con HRas, regula negativamente la formación de nanoclusters de KRas 4B (Blazevits 2016).

Además de formando nanoclusters y monómeros, parece que Ras existe también como un homo-dímero (Nan 2013, Nan 2015, Santos 2014, Santos 1988), se ha propuesto que la dimerización de Ras en la membrana plasmática podría ser fundamental en la activación de C-Raf (Inouye 2000). Por otra parte, Lin *et. al.* observaron que HRas forma dímeros mediante interacciones proteína-proteína (Lin 2014), con el sitio de dimerización localizado en la región Switch II (residuos 60-76). Por otra parte, Nussinov *et. al.* demostraron recientemente que el dominio catalítico de KRas-GTP puede formar dímeros estables a través de dos interfaces diferentes: una que involucra el Switch I y las regiones de unión a efectores y que, por tanto, podría resultar en una pérdida de interacción de Ras con sus efectores, y otra a través de las hélices  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$  (Muratcioglu 2015). Por otra parte, también se ha observado que NRas (Güldenhaupt 2012) forma dímeros en membranas artificiales unido a GDP.

### 3. Papel de Ras en el sistema inmune

El interés en el campo de la inmunología por las GTPasas surgió a principios de la década de 1990 con la observación de que Ras se acumula en su estado activo en respuesta a la estimulación del receptor de células T (TCR) (Downward 1990, Acuto 2000, Genot 2000). Ras se activa de forma rápida y sostenida tras la estimulación del TCR. Así mismo, también puede activarse por determinadas citoquinas de origen hematopoyético, como IL-2 e IL-15. La mayor parte del trabajo *in vivo* realizado se basa sin embargo en la elucidación del papel de Ras en el desarrollo de células T (Cantrell 2002), específicamente, Ras es requerido para la selección positiva de linfocitos T en el timo (Swan 1995, Alberola-Ila 1996, Alarcon 2012). Un paso importante en la maduración de linfocitos T es el reordenamiento de la cadena  $\alpha$  del TCR, lo que resulta en la expresión de un TCR  $\alpha/\beta$  maduro. La ausencia de Ras bloquea la transición desde el pre-TCR al TCR maduro, lo que pone de manifiesto su papel crítico en este proceso (Mor 2007). Los linfocitos T que expresan un TCR maduro pueden ser subsiguientemente seleccionados negativa o positivamente, previamente a su salida a la periferia. Este proceso requiere de un factor de transcripción, GATA3, que se une a las regiones potenciadoras (enhancer) de los 4 genes del TCR, proceso en el que Ras estabiliza GATA3 intracelular (Yamashita 2005). Siguiendo con el desarrollo de linfocitos T en el timo, el siguiente paso es la expresión de los receptores CD4 y CD8 que progresan de un estadio doble (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) a doble positivo (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) para llegar finalmente al de simple positivo (CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>) (Alberola-Ila 2003). La sobreexpresión de Ras en linfocitos doble negativos es fundamental para progresar al estadio doble positivo y su expansión final a simples positivos (Swat 1996).

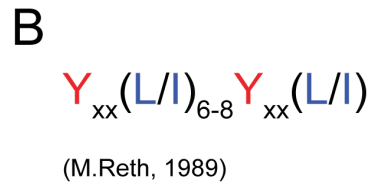
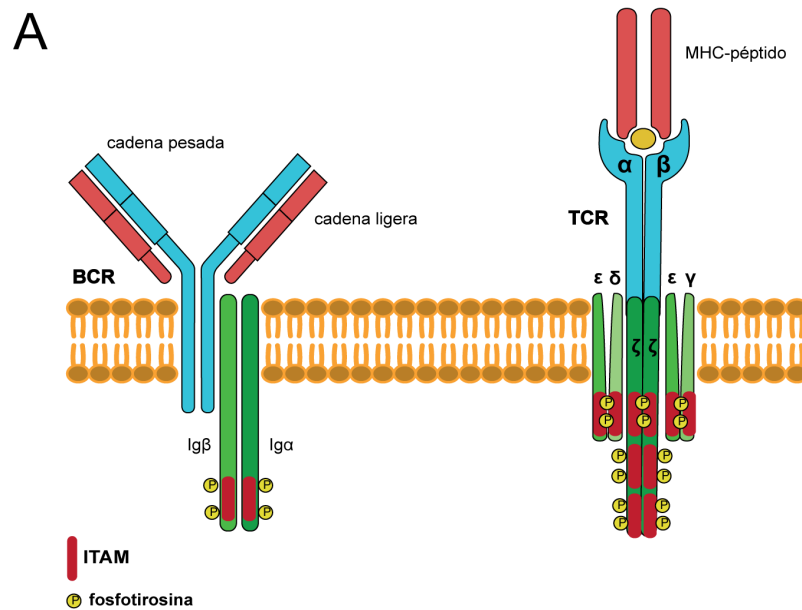
En cuanto al papel de formas concretas de Ras, también se aprecian diferencias en cuanto a su contribución en distintos aspectos de la biología de linfocitos T y B. En células Jurkat estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 sólo se activa NRas; teniendo lugar esta activación exclusivamente en el Golgi (Perez de Castro 2004), lo que explica que ratones deficientes en NRas generan un número de linfocitos CD8 mucho menor que los ratones silvestres (Perez de Castro 2003). Otro estudio reciente apunta, sin embargo a que tanto HRas como NRas son prescindibles en el desarrollo tímico, aunque su ausencia produce en linfocitos CD4 una marcada deficiencia en la producción de interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), una citoquina producida en respuestas tipo Th1. Como consecuencia, los ratones no son capaces de montar una respuesta efectiva, *in vivo*, contra parásitos intracelulares como *Leishmania major* (Iborra 2011).

Además de ser importante para el desarrollo de linfocitos T, Ras también es necesario para el desarrollo del linaje B desde estadios tempranos, puesto que la expresión de una forma dominante negativa de Ras en células B paraliza su desarrollo antes de comenzar la fase pre-B de su diferenciación (Iritani 1997).



## 4. Receptores para antígeno

Los receptores para antígeno, tanto de células T como de células B (BCR), son moléculas clonotípicas específicas de antígeno, esenciales para la respuesta inmune. Ambos se localizan en la membrana plasmática y están compuestos por distintas unidades; una parte se encarga del reconocimiento y la otra de la transducción de señales. Esta separación les confiere una gran flexibilidad, en cuanto que permite obtener una gran diversidad genética para reconocer múltiples tipos de antígeno (Alarcón 2003).



**Figura 12: Organización y estructura de los receptores para antígeno.** A) Organización del TCR y BCR en la PM, con sus subunidades. B) Secuencia de aminoácidos consenso de los motivos ITAM.

#### 4.1 Organización del TCR y BCR en la membrana plasmática

El receptor TCR convencional ( $\alpha\beta$ ) se expresa en la mayor parte de los linfocitos T y consiste en dos cadenas polimórficas glicosiladas unidas por puentes di-sulfuro, que a su vez están unidas de manera no covalente a las subunidades CD3 no-polimórficas (Figura 12). Existen cuatro tipos de cadenas CD3: CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , y CD3 $\zeta$ , que a su vez se organizan en dímeros (Figura 12). La estructura de las cadenas polimórficas del TCR comprende una parte n-terminal que acoge el dominio variable de 104-125 aminoácidos de longitud, y un dominio constante de entre 90 y 129 aminoácidos conectados a través de un péptido de 21-62 aminoácidos; una sección transmembrana de 17-26 aminoácidos y una cola citoplásmica de unos siete aminoácidos (Lefranc 1990). Cada uno de los dominios constante y variable adopta un plegamiento de tipo inmunoglobulina formado por láminas tipo  $\beta$  antiparalelas (Clevers 1988, Williams 1988).

Al igual que el heterodímero  $\alpha\beta$ , las cadenas CD3 $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  también poseen un plegamiento de tipo inmunoglobulina en su extremo n-terminal extracelular (Williams 1988). La cadena  $\zeta$ , en cambio, no lo posee debido que su n-terminal es muy corto, de tan solo nueve aminoácidos. En consecuencia, la mayor parte de la secuencia de CD3 $\zeta$  (112 de 142 aminoácidos) se encuentra dentro del citoplasma. Todas las subunidades CD3 están unidas por pares mediante puentes di-sulfuro.

La biosíntesis y ensamblaje del TCR en la membrana plasmática es un proceso complejo que se diferencia de otros receptores de membrana, como los receptores tirosina quinasa. Una célula T es incapaz de reconocer antígenos, a no ser que el complejo TCR, con todas sus unidades, esté correctamente ensamblado en la membrana (Clevers 1988, Ashwell 1990, Klausner 1990). Los genes de todas las unidades que componen el TCR se expresan de manera secuencial durante las sucesivas etapas de maduración de los linfocitos T. Las unidades que más tempranamente se expresan son las cadenas CD3, pero estas permanecen dentro de la célula. El ensamblaje de todos los componentes se realiza en el retículo endoplásmico a medida que se van sintetizando sus componentes. La última cadena en sintetizarse es la cadena  $\alpha$ . Una vez ensamblada, todo el complejo es transportado a la membrana plasmática.

El receptor para antígeno de células B (BCR), al igual que el TCR, es un complejo transmembrana compuesto por varias unidades (Figura 12), entre las que se incluye una molécula de inmunoglobulina compuesta por dos cadenas: una cadena pesada (HC) unida por puentes di-sulfuro a otra cadena ligera (LC) (Brezski 2008, Reth 1992). El extremo n-terminal de la molécula de inmunoglobulina se caracteriza por una gran variabilidad en su secuencia, fruto de recombinaciones, adición de nucleótidos e hipermutación somática. Es esta zona, denominada *región determinante de la complementariedad* (CDR), la responsable de la especificidad clonal de reconocimiento de antígeno, además de la afinidad de la interacción con este.

De manera análoga a lo que ocurre en el TCR, el BCR, además del componente de reconocimiento de antígeno, posee dos unidades adicionales: Ig $\alpha$  (CD79a) e Ig $\beta$  (CD79b), responsables de la transducción de señales (Figura 12). Estos dos

componentes juegan el mismo papel que las subunidades CD3 en el TCR. Una molécula simple de BCR contiene dos cadenas pesadas, dos ligeras, una cadena Ig $\alpha$  y una cadena Ig $\beta$  (Schamel 2000). El extremo c-terminal de la cadena pesada es invariable y se denomina *región constante* y es la que determina el isotipo de la Ig. Existen cinco clases: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. De ellos, IgM e IgD se expresan en linfocitos B naive, recién generados, mientras que los otros isotipos se expresan típicamente en linfocitos activados o de memoria.

#### 4.2 ITAMs: Unidades de señalización

Como se ha comentado en el apartado anterior, tanto el heterodímero  $\alpha/\beta$  en el caso del TCR, como la molécula de inmunoglobulina en el caso del BCR, únicamente participan en el reconocimiento de antígeno. El cometido de transformar el contacto con el antígeno, en respuestas intracelulares, reside en las unidades CD3 y en las cadenas Ig $\alpha$  e Ig $\beta$ . Todas estas subunidades tienen secuencias ITAM (*Immune-receptor-Tyrosine-based-Activation-Motif*) (Figura 12), que son secuencias conservadas identificadas hace más de 20 años (Reth 1989, Underhill 2007), como críticas para la iniciación de la respuesta celular a la unión del antígeno. Receptores que contengan ITAMs están presentes en gran parte de las poblaciones celulares del linaje hematopoyético, incluyendo, además de las células T y B, células NK (*Natural Killer*), macrófagos, células dendríticas y plaquetas. También se hallan presentes en algunas proteínas de origen vírico (Willems 1995, Miller 1994, Lagunoff 1999). Estos ITAMs víricos, parecen actuar suprimiendo la señalización de los ITAMs endógenos, adueñándose de toda la maquinaria de señalización, y favoreciendo la patogénesis viral.

Inicialmente la caracterización de los ITAMs se realizó con moléculas quiméricas consistentes en una parte extracelular heteróloga y la parte intracelular de las subunidades CD3 con sus correspondientes ITAMs (Irving 1991, Romeo 1991). El entrecruzamiento de estas moléculas reproducía la respuesta provocada por el TCR completo. Además, la mutación de cualquiera de las dos tirosinas del ITAM provocaba la anulación de la señal (Romeo 1992, Letourneur 1992). El TCR contiene 10 secuencias ITAM distribuidas entre las cuatro cadenas CD3 (cada cadena de CD3 $\zeta$  posee tres ITAMs) mientras que el BCR, posee dos ITAMs distribuidos por igual entre las dos cadenas intracelulares.

El grado de fosforilación de los ITAMs del TCR, así como el orden en que lo hacen, ha sido objeto de estudio debido a la creencia de que ésto puede influir la señalización desde el TCR. Los primeros experimentos llevados a cabo revelaron la existencia de dos formas fosforiladas predominantes de CD3 $\zeta$ : p21- $\zeta$ , y p23- $\zeta$  (el número indica la masa molecular en kDa) (Pitcher 2003, Pitcher 2003). Subsecuentemente, se comprobó que la forma p21- $\zeta$  que es detectada en timocitos no estimulados y en células T activadas con un agonista parcial, contiene ITAMs parcialmente fosforilados que son incapaces de unirse a Zap70. Sin embargo, la forma p23- $\zeta$ , que se forma únicamente tras la estimulación a través del receptor, contiene los ITAMs totalmente fosforilados y por tanto, susceptibles de unir Zap70 (Sloan-Lancaster

1994, van Oers 1994, Madrenas 1995). Estos descubrimientos, llevaron a pensar que la fosforilación parcial de los ITAMs, podría tener un efecto inhibitorio, en cuanto a que podría inducir anergia (Kersh 1999). En uno de los mecanismos propuestos para explicar estas consecuencias, se propuso que la fosforilación parcial podría resultar en la generación de secuencias similares a las ITIM (*Immunoreceptor-tyrosine-based-inhibitory-motif*). Estos motivos se encuentran en las colas citoplásmicas de algunos receptores de células inmunes, y reclutan, una vez que se fosforilan sus tirosinas, fosfatasas como SHP-1 al TCR (Barrow 2006, Pinheiro da Silva 2008). Sin embargo, otros estudios apuntan a que p21- $\zeta$  podría representar un estado “pre-activado” que facilitaría una rápida activación celular (Witherden 2000). Estudios en ratones transgénicos mostraron que la generación de la forma p21- $\zeta$  no es esencial para generar una respuesta anti-proliferativa en células T. Adicionalmente, se observó que p23- $\zeta$ , tampoco es esencial para la proliferación celular dependiente de antígeno (Pitcher 2003, Ardouin 1999).

## 5. Familia de GTPasas RRas

La familia de Rras está compuesta por tres miembros: RRas (propriadamente dicho), RRas2 (TC21) y RRas3 (Mras) (Figura 2). El gen de Rras se aisló por vez primera con una sonda de baja astringencia contra HRas viral (Lowe 1987). RRas2 se identificó usando una sonda mixta que hibridaba cerca de la región switch II, en una librería de cDNA de una línea celular de teratocarcinoma humano (Drivas 1990). RRas3 se aisló de cDNA procedente de una línea celular (C2) de músculo esquelético de ratón (Matsumoto 1997, Kimmelman 1997).

La familia de RRas comparte aproximadamente un 55% de homología de secuencia con las Ras clásicas (Figura 13), siendo la región c-terminal hipervariable (HVR) donde se concentran las mayores diferencias entre los distintos miembros. Por el contrario, los aminoácidos que componen el “núcleo” de la región a la que se unen los efectores están perfectamente conservados (32 a 40 en HRas).

hHRas	-----MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVFVDEYDP	
hNRas	-----MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVFVDEYDP	
hKRas	-----MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQNHVFVDEYDP	
hTC21	-----MAAAGWRDGSQEKYRLVVVGGGGVGKSALTIQFIQSYFVTDYDP	
hRRas	MSSGAASGTGRGRPRGGPGPGDPPPS <b>ETH</b> KLVVVGGGGVGKSALTIQFIQSYFVSDYDP	
hMRas	-----MATSAVPSDNLPTYKLVVVGDDGGVGKSALTIQFFQKIFVFDYDP	
	p-loop (G1)	switch I
hHRas	TIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIH	
hNRas	TIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFADIN	
hKRas	TIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIH	
hTC21	TIEDSY <b>TKQ</b> VID <b>DRAAR</b> LILDITAGQEE <b>FGAMRE</b> QYMRTGEGFLV <b>FSV</b> TD <b>RG</b> S <b>FEE</b> IY	
hRRas	TIEDSY <b>TKICS</b> VDGIP <b>AR</b> LILDITAGQEE <b>FGAMRE</b> QYMRAGHGFLVFAIN <b>DRQ</b> SFNEVG	
hMRas	TIEDSYLK <b>HT</b> EDNQ <b>WAT</b> L <b>LD</b> VLDTAGQEE <b>FSAMRE</b> QYMRTGDGFLIV <b>SV</b> TDKASF <b>EH</b> VD	
	(G2)	Switch II (G3)
hHRas	QYREQIKRVKSDDDVPMVLVGNKCDLA-ARTVESRQAQDLARSYGIPYIETSAKTR-QGV	
hNRas	LYREQIKRVKSDDDVPMVLVGNKCDLP-TRTVDTKQAH <b>ELAK</b> SYGIPFIETSAKTR-QGV	
hKRas	HYREQIKRVKSDDDVPMVLVGNKCDLP-SRTVDTKQAH <b>ELAK</b> SYGIPFIETSAKTR-QGV	
hTC21	K <b>FQR</b> QILRVK <b>DR</b> EF <b>PMIL</b> IGN <b>KAD</b> L <b>DHQR</b> QVT <b>QEEG</b> QLAR <b>QLK</b> VTY <b>MEASAKIR</b> -MNV	
hRRas	K <b>LFT</b> QILRVK <b>DRDD</b> FPVVLVGN <b>KADLESQR</b> QVPR <b>SEASAF</b> GASHH <b>VAYFEASAKLR</b> -LNV	
hMRas	R <b>FHQ</b> LILRVK <b>DR</b> ES <b>FPMIL</b> VANKVD <b>LMHLR</b> KIT <b>RE</b> Q <b>QKEMAT</b> KHNIPYIETSAK <b>DPPL</b> NV	
	G4	G5
hHRas	EDAFYTLVREIRQHKLRLNP---PDESGPGCMSC---KCVLS 189	
hNRas	EDAFYTLVREIRQYRMKLNLS---SDDGTQGC <b>MGL</b> ---PCVVM 189	
hKRas	D <b>DA</b> FYTLVREIR <b>KHKE</b> KMSKD---G <b>KKKK</b> SKT---KCVIM 188	
hTC21	D <b>QAF</b> HELVRVIR <b>KFQE</b> Q <b>CP</b> PS <b>PEPTR</b> KEKD <b>KKGC</b> ---HCVIF 204	
hRRas	D <b>EAF</b> EQLVRAVR <b>KYQE</b> EL <b>PPSP</b> -PSAPR <b>KKGGC</b> ---PCVLL 218	
hMRas	D <b>KAF</b> HDLVRVIR <b>Q</b> Q <b>IP</b> KSQ <b>KKKK</b> TKWRGDRATGTH <b>KLQCVIL</b> 208	
	C-terminal hipervariable	

**Figura 13: Comparativa de secuencia entre las Ras clásicas y la familia Rras.** La secuencia de aminoácidos de las Ras clásicas, se compara con la secuencia de aminoácidos de la familia de Rras. Los aminoácidos compartidos por al menos dos Ras “clásicas”, están coloreados en rojo. Los aminoácidos de R Ras2 que difieren de las Ras “clásicas” están coloreados en azul negrita. Las posiciones no conservadas entre R Ras2 y las Ras “clásicas”, están coloreadas en violeta. Modificado de Alarcon 2012).

El patrón de expresión de R Ras3 está restringido al cerebro y a músculo esquelético, mientras que el de R Ras y R Ras2 es ubicuo. Por otra parte, sólo R Ras2 además de las Ras “clásicas”, posee capacidad para transformar células epiteliales y fibroblastos, por sí mismo (Cox 1994, Graham 1999, Graham 1994). R Ras, en cambio, tiene un potencial oncogénico mucho menor, aunque puede transformar células 3T3 cuando está mutado de forma oncogénica en los codones 38 y 87 (equivalentes a los codones 12 y 61 en H Ras) (Saez 1994). R Ras2 también ha sido hallado mutado en forma oncogénica en diversos tipos de cáncer humano: en leiomiomasarcoma (Huang 1995) y en cáncer de ovario (Chan 1994). En la mayoría de los casos, la mutación es en el codón 72 de R Ras2, el equivalente al codón 61 en Ras (Chang 2016), aunque también se ha encontrado mutado en otros codones: R63Q, K53M y R117C entre otros, han aparecido en muestras de adenocarcinoma de colon; K159Q en cáncer de células renales e Y105C en adenocarcinoma de pulmón (www.cbioportal.org). Sin embargo, la mayor parte de las veces, R Ras2 se halla sobreexpresado en su forma silvestre, en una amplia variedad de tumores. Tal es el caso del cáncer de mama (Clark 1996, Barker 1998, Rokavec 2008) y del carcinoma hepatocelular (HCC) (Luo 2010). En este último, R Ras2 promueve la

metástasis de las células tumorales *in vitro*, alterando la expresión de E-cadherina y N-cadherina. También se ha observado que la expresión de la forma oncogénica G23V (equivalente a la G12V en Ras) de RRas2 contribuye a la tumorigénesis primaria de líneas celulares de cáncer de mama que expresan tanto Ras activo como RRas2 G23V, cuando se inyectan subcutáneamente. Así mismo, también está involucrado en metástasis, y aunque no es capaz de iniciarla por sí sólo, sí es capaz de mantenerla. La forma silvestre de RRas2, también produce los mismos efectos que la oncogénica, aunque más suavizados (Larive 2014).

También se ha encontrado sobre-expresión de RRas2 en tumores de esófago (Sharma 2005), en los que su eliminación mediante siRNA sensibiliza a las células cancerosas para el tratamiento con cis-platino (Hasan 2012). Así mismo, RRas2 también se encuentra sobre-expresado en cáncer de células escamosas de tejido oral (OSCC) (Arora 2005, Macha 2010), así como en diversos tipos de cáncer de piel de carácter agresivo (Lee 2011). También se ha encontrado sobre-expresado en diversos tipos de linfoma (Delgado 2009), y por su posición en el genoma, ha sido hallado como sitio de inserción frecuente de retrovirus que inducen de forma experimental linfomas de tipo T (Kim 2003).

RRas2 juega un papel importante en el desarrollo de las glándulas mamarias. Se observó que en ratones con cinco semanas de vida, deficientes (KO) para RRas2, las glándulas mamarias son notablemente más pequeñas. Sin embargo, estas diferencias desaparecen cuando el ratón alcanza las doce semanas de vida, lo que sugiere que la ausencia de RRas2 genera un retraso en el desarrollo adulto de esta glándula (Larive 2012).

En nuestro laboratorio se descubrió que RRas2 juega un papel fundamental en la señalización homeostática a partir de los receptores de antígeno (Delgado 2009). RRas2 lleva a cabo este proceso mediante la asociación con PI3K, en concreto con la subunidad catalítica P110 $\delta$ . Los ratones deficientes en RRas2 poseen menos poblaciones de células T (en particular las células T de memoria) y B, aunque ello no afecta al desarrollo de éstas (Delgado 2009). Además, los linfocitos de ratones KO para RRas2, muestran una menor viabilidad *in vitro*. Por otra parte, un mutante dominante negativo (DN) (S28N) de RRas2, incapaz de realizar el ciclo GDP-GTP, provoca una disminución notable en la viabilidad celular, tanto en la línea Jurkat, como en linfocitos T primarios (Delgado 2009). Estas células expresan más anexina V, un marcador característico de procesos apoptóticos y una disminución en los niveles de pAKT S473. Por el contrario, la forma silvestre y la oncogénica aumentan estos niveles. Estos datos indican que RRas2 es necesario para la supervivencia de linfocitos T y B a través de la activación de PI3K.

RRas2 también contribuye a la internalización del TCR desde la sinapsis inmunológica (IS) (Martinez-Martin 2011). Este proceso sólo se produce con Ras2 en su forma silvestre, y no con las formas oncogénica o DN. RRas2 se localiza junto con el TCR en la IS de células contactadas previamente por células presentadoras (APC) cargadas con enterotoxina B de *Staphylococcus Aureus* (SEE) y su co-internalización en vesículas (no dependientes de clatrina) se produce transcurridos unos 7 minutos desde el contacto con la célula APC. Por otra parte, también se demostró, en este mismo

trabajo, que la GTPasa RhoG participa junto con RRas2 en la internalización del TCR. De hecho, mutaciones de RhoG, provocan el mismo resultado que las de RRas2 (Martinez-Martin 2011).

## RESULTADOS

El estudio de RRas2 en nuestro laboratorio comenzó a raíz de la búsqueda de nuevas proteínas que interaccionaran con la cadena CD3 $\gamma$ , mediante un ensayo de doble híbrido (Aronheim 2001, Delgado 2009). Anteriormente, se había detectado que las cadenas CD3 del TCR, en concreto CD3 $\zeta$  (Franco 1994) y CD3 $\gamma$  (Peter 1992), son capaces de unir nucleótidos de guanosina, tanto GTP como GDP. En el caso de CD3 $\zeta$  de ratón, el sitio de unión de nucleótido se sitúa en el tercer ITAM (C) de la secuencia. En el caso de CD3 $\gamma$ , son los residuos K128 y G134 los responsables de la asociación. Asimismo, se detectó actividad GTPasa asociada a las cadenas CD3 $\gamma$  y CD3 $\zeta$  (Peter 1993, Sancho 1993).

Posteriormente al descubrimiento en nuestro laboratorio de RRas2 asociado a la cadena CD3 $\gamma$ , se demostró mediante co-transfección que RRas2 WT es de hecho capaz de asociarse a todas las subunidades CD3 (Delgado 2009). Curiosamente, esta interacción era más fuerte cuando RRas2 tenía una mutación inactivadora (DN), que lo hace estar cargado con GDP, que cuando tenía una mutación activadora (ONCO), que lo hace estar cargado con GTP. RRas2 silvestre también interaccionaba menos que el DN, lo que hace suponer que la mayor parte de RRas2 en la célula está cargado con GTP.

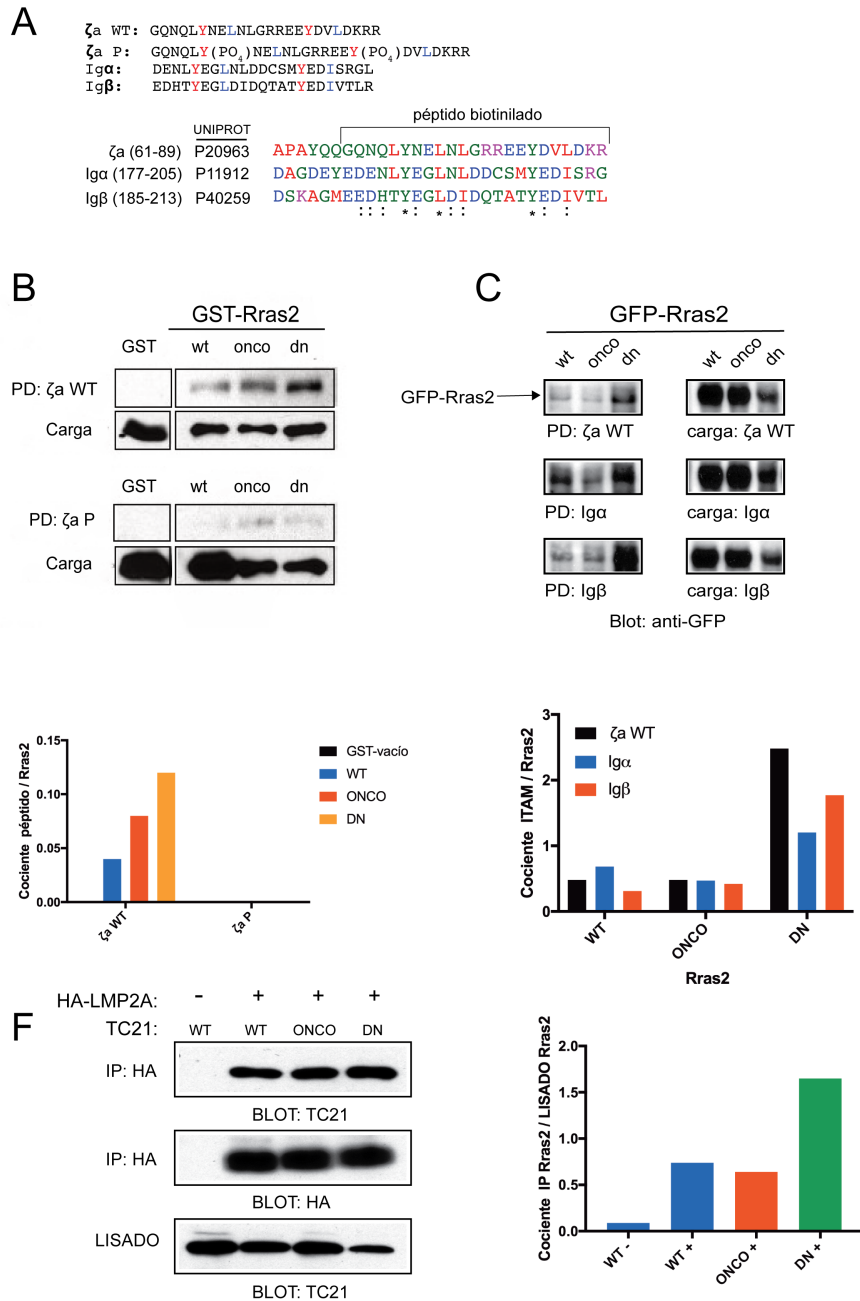
En el hibridoma de ratón 2B4, RRas2 endógeno coprecipitaba junto con el TCR, tanto en condiciones de no estimulación como cuando se estimulaba el receptor con un anticuerpo anti-CD3 + pervanadato (Delgado 2009). De estos datos se deduce que Rras2 se une de manera constitutiva al TCR. Por otra parte, en experimentos de pull-down HRas coprecipitaba en mayor medida con el RBD de Raf1 en células previamente estimuladas con anti-CD3 (Delgado 2009), mientras que RRas2 coprecipitaba también en células sin estimular. De hecho, al estimularlas con anti-CD3, apenas aumentaba la cantidad de RRas2 que podía unirse al RBD. En este mismo trabajo, también se observó la asociación de RRas2 al BCR, en una línea celular de ratón que expresaba bien IgD, bien IgM.

Tomando estos antecedentes como base, realicé una serie de experimentos que expongo a continuación, con el fin de establecer una relación funcional entre los receptores de antígeno y RRas2.



## 1. RRas2 se asocia de manera directa a secuencias ITAM

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, nos propusimos averiguar si RRas2 se asocia a secuencias ITAM presentes en distintos receptores y, por otra parte, comprobar si esta asociación se produce de manera directa.



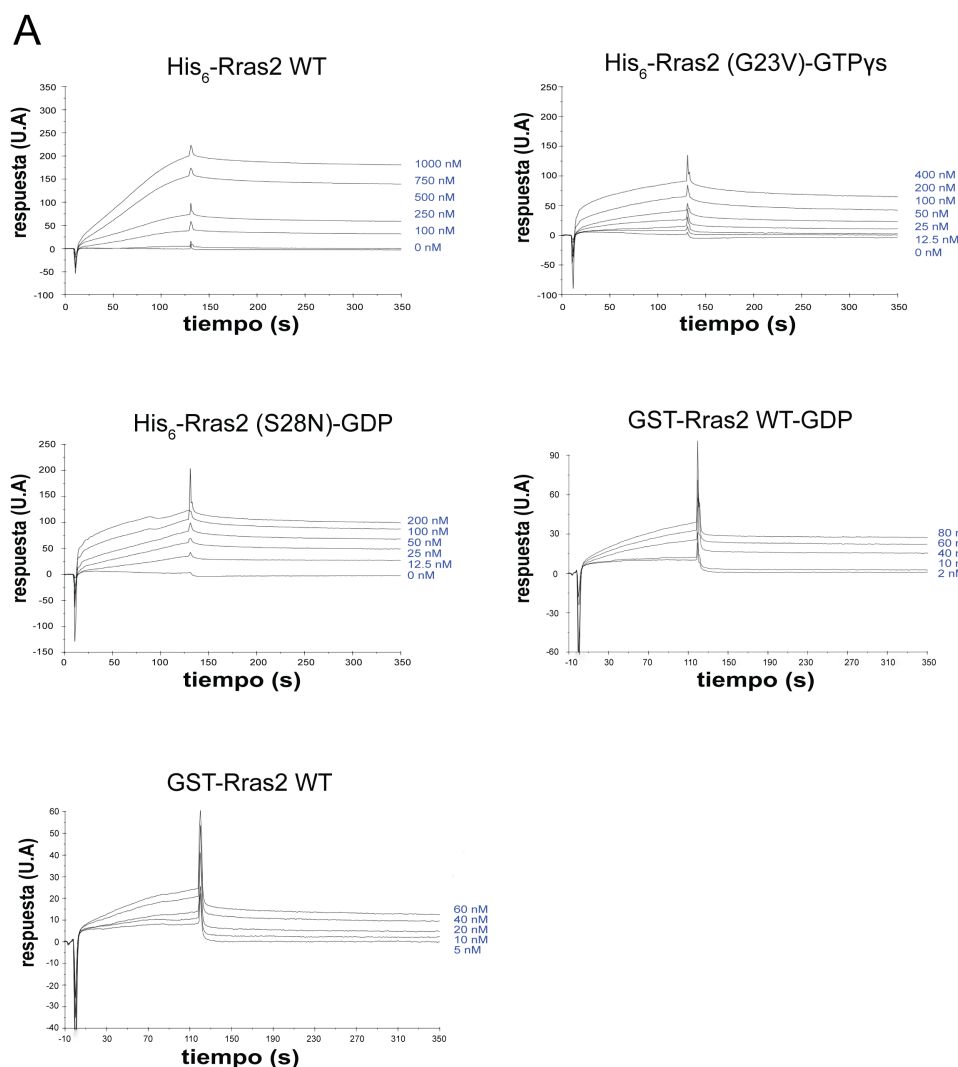
**Figura 14: RRas2 interacciona con secuencias ITAM.** A) Alineación y comparativa de los péptidos empleados: \* indica identidad; : indica conservación entre aminoácidos de características parecidas. B) Asociación *in vitro* de GST-RRas2 y el ITAM A de CD3 $\zeta$  sin fosforilar y fosforilado. Debajo se muestra su densitometría. C) Pull-Down con los ITAMs biotinilados de  $\zeta_a$ ,  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$  en lisados de células COS-7 transfectadas con GFP-RRas2. En la parte inferior se muestra la densitometría. D) Asociación entre HA-LMP2A y RRas2 por co-precipitación, en lisados de células COS-7 co-transfectadas con ambas proteínas, e inmunoprecipitadas con anti-HA. A su derecha se muestra la densitometría del blot. Para cada panel, se muestra un experimento representativo, de tres realizados.

En experimentos *in vitro*, con proteína recombinante de RRas2, ésta se asociaba directamente al ITAM  $\zeta$ a WT de manera dependiente del nucleótido (Figura 14B), siendo el mutante DN (GDP) al que mejor se une. Curiosamente, la forma silvestre se unía débilmente, lo que podría indicar que se encuentra mayoritariamente cargada con GTP. Sin embargo, cuando el péptido estaba fosforilado en ambas tirosinas ( $\zeta$ a P), la asociación se perdió independientemente de que RRas2 estuviera en forma silvestre, en forma constitutivamente activa (ONCO), o dominante negativa (DN). Parece, por lo tanto, que RRas2 interacciona de manera más favorable en forma GDP con el ITAM no fosforilado.

En un experimento subsiguiente quisimos comprobar si la asociación también se producía con otras secuencias ITAM no pertenecientes a las subunidades CD3. Para esto, elegimos los ITAMs de las cadenas Ig $\alpha$  e Ig $\beta$ . En un experimento de pull-down (PD) utilizando péptidos consistentes en las secuencias ITAM de Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  a partir de lisados de células 293T transfectadas transitoriamente con las construcciones de RRas2 wt, onco (G23V) y dn (S28N) fusionados a GFP, pudimos comprobar que se mantenía la misma tendencia en cuanto a la afinidad mostrada según la carga de nucleótido (Figura 14C). Se pudo apreciar además una interacción diferencial entre los tres tipos de ITAM, siendo la de Ig $\alpha$  ligeramente mayor que la de los otros dos. La presencia de los motivos ITAM no está únicamente restringida a los receptores de células del sistema inmune. Existen otras proteínas, codificadas por genes víricos que también los poseen. Uno de estos ITAMs es el de la proteína LMP2A del virus de Epstein-Barr, que infecta a células B. En este caso, pudimos ver en un ensayo de co-transfección en células COS-7 con HA-LMP2A y GFP-RRas2, que después de inmunoprecipitar LMP2A, Rras2 se asociaba a ésta, manteniéndose la predilección por la forma GDP de RRas2 (Figura 14D).

El siguiente paso, una vez comprobada la interacción entre RRas2 y las secuencias ITAM, fue la obtención de datos cuantitativos que permitieran afianzar lo anteriormente observado. Para ello, hicimos uso de técnicas de resonancia de plasmomes de superficie (Biacore) para determinar las constantes de afinidad. Utilizamos chips de Ni-NTA, para inmovilizar las construcciones de His<sub>6</sub>-RRas2 de manera directa y dirigida, o bien las construcciones fusionadas a GST, en este caso sobre chips estándar CM5, e inmovilizadas mediante acoplamiento de aminas. Se utilizaron proteínas de secuencia silvestre o mutada producidas en E.Coli y cargadas, una vez purificadas con GDP o con el análogo no hidrolizable GTP $\gamma$ S, o se utilizaron tal como venían cargadas de las bacterias. En la fase fluida se pasó el péptido  $\zeta$ a en diferentes concentraciones para medir las constantes de asociación y disociación. Como puede verse en la Figura 15, las constantes de disociación ( $K_{off}$ ) fueron en todos los casos muy bajas, lo que indica la formación de una asociación muy estable. Las constantes de afinidad ( $K_D$ ) calculadas mediante el cociente  $K_{off}/K_{on}$  mostraron que la interacción  $\zeta$ a-RRas2 es de alta afinidad, ente 1 y 23nM (Figura 15B). Hay que remarcar que la afinidad del mutante DN (S28N) es 10 veces superior a la del mutante constitutivamente activo (G23V), lo que confirma los datos anteriores de co-purificación, que indicaban una mayor afinidad de la forma GDP que la de la forma GTP. De hecho, cuando la proteína

silvestre recombinante GST-RRas2 se cargó *in vitro* con GDP, la afinidad resultó ser de 2.9nM, parecida a la del mutante DN. Sorprendentemente, la afinidad de la proteína silvestre tal y como se extrae de E.Coli, es de 22-23nM, más parecida a la del mutante G23V cargado con GTP $\gamma$ s que a la de las formas con GDP.



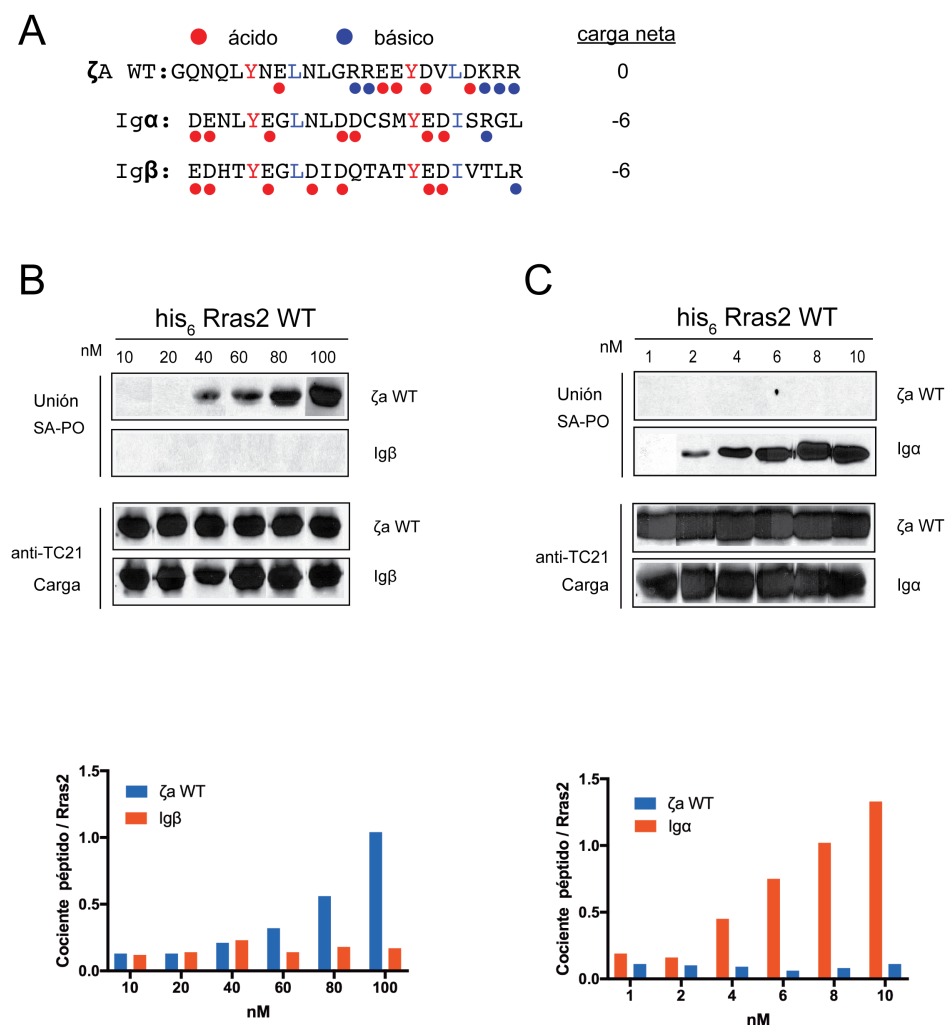
**Figura 15: Afinidad entre RRas2 y ζa WT:** A) Curvas de asociación-Disociación para cada interacción. En los casos en los que no se indica el nucleótido, las proteínas se han utilizado con el nucleótido con el que han sido purificadas. B) Tabla resumen con las constantes de afinidad. En todos los casos, RRas2 se inmovilizada al chip, mientras que el péptido biotinilado ζa WT se inyecta en la fase fluida. Se muestra un experimento representativo, de dos realizados.

En un siguiente ensayo de far western blot *in vitro* con las secuencias ITAM de Igα e Igβ, que amplía el resultado obtenido en la Figura 14, se pudo comprobar que al igual que ocurre con ζa WT, la asociación es directa (Figura 16). Además, queda patente

la diferencia en afinidad que se observó en un primer momento en los lisados de células COS-7 entre los tres ITAMs; siendo el orden de afinidades  $Ig\alpha > \zeta_a > Ig\beta$ .

## 2. La asociación a los ITAMs es dependiente de las tirosinas y leucinas conservadas

El paso siguiente fue determinar si los residuos conservados de las secuencias ITAM, las tirosinas y las leucinas, que forman la plataforma donde se acoplan proteínas con dominios SH2, son necesarias también para la interacción con RRas2.

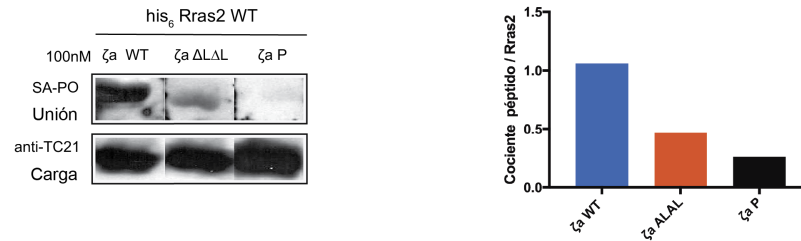


**Figura 16: RRas2 se asocia con distinta afinidad dependiendo del ITAM:** A) Péptidos utilizados en el experimento, con indicación de los residuos cargados. B) Far western blot mostrando la interacción de los péptidos biotinilados  $\zeta_a$  WT e  $Ig\beta$  incubados a distintas concentraciones con una cantidad fija de His<sub>6</sub>-RRas2 WT, inmovilizado en la membrana. C) Far western blot entre una cantidad fija de His<sub>6</sub>-RRas2 wt (inmovilizado en la membrana) y distintas concentraciones de los péptidos biotinilados de  $\zeta_a$  e  $Ig\alpha$  SA-PO (estreptavidina peroxidasa). En ambos casos, se muestra un experimento representativo de dos realizados.

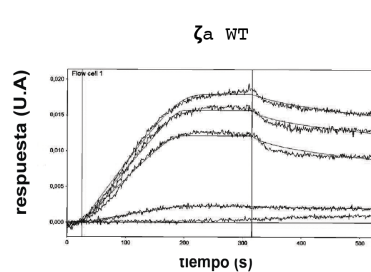
A

$\zeta_a$  WT: GQNQLYNE<sup>L</sup>NLGRREEYDVLDKRR  
 $\zeta_a$  ALAL: -----A--L-----A--L-----  
 $\zeta_a$  P: GQNQLY(PO<sub>4</sub>)NE<sup>L</sup>NLGRREEY(PO<sub>4</sub>)DVLDKRR

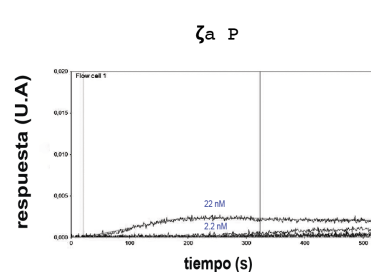
B



C



D

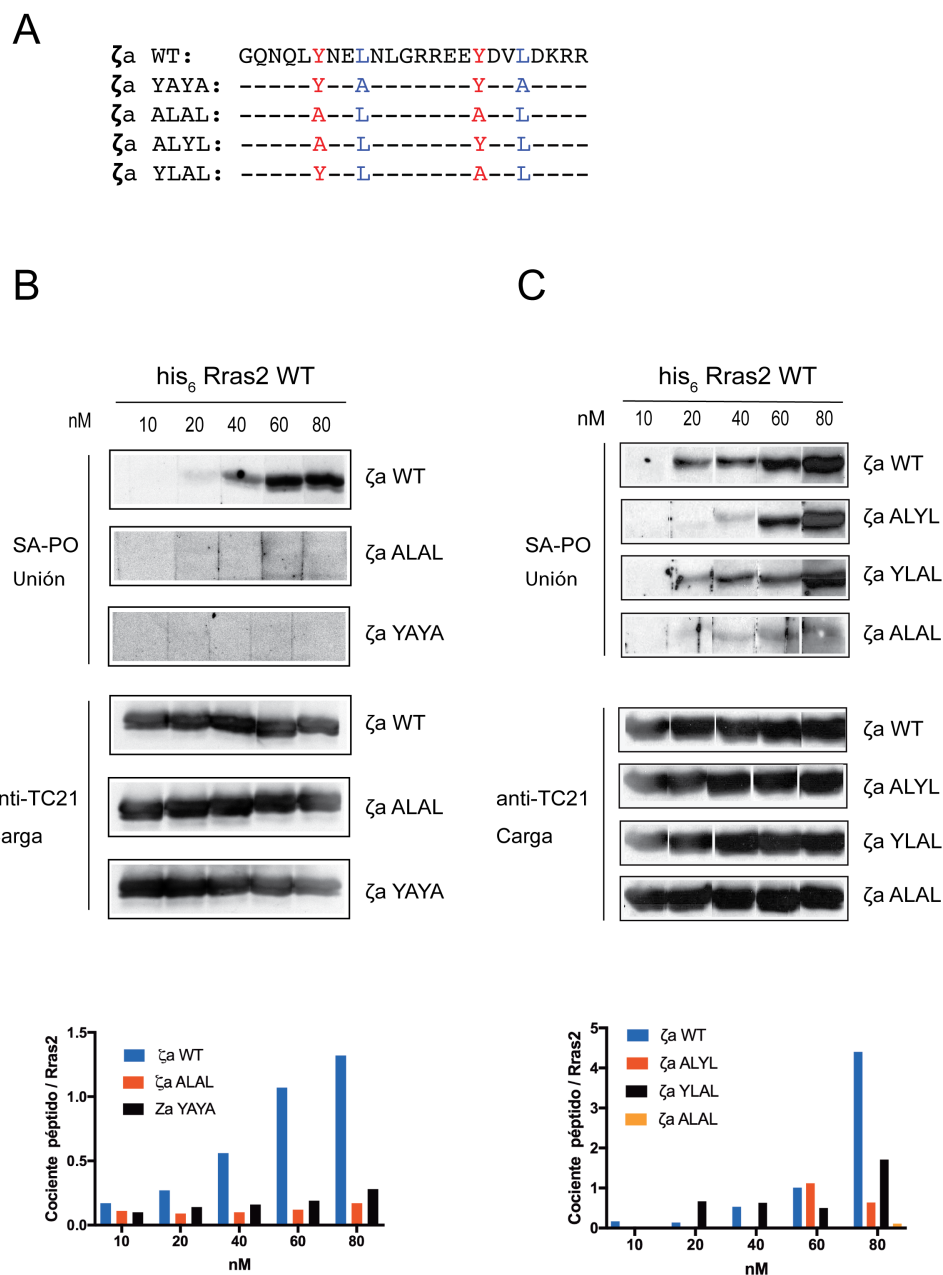


E

Rras2	péptido	$K_{on}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$K_{off}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (nM)
GST-Rras2 WT	$\zeta_a$ WT	$1.04 \cdot 10^8$	1.508	14
GST-Rras2 WT	$\zeta_a$ P	$1.72 \cdot 10^4$	2.986	$1.1 \cdot 10^4$

**Figura 17: Las tirosinas del ITAM son imprescindibles para la asociación .** A) Péptidos utilizados en los experimentos. B) Far western blot utilizando His<sub>6</sub>-Ras2 wt inmovilizado en la membrana, y los péptidos  $\zeta_a$  WT,  $\zeta_a$  ALAL y  $\zeta_a$  P, a una concentración de 100nM. Se muestran datos de un sólo experimento. C, D) Ensayo de Biacore utilizando GST-RRas2 wt inmovilizado frente al péptido  $\zeta_a$  WT y  $\zeta_a$  P en fase fluida. E) Tabla resumen con las constantes de afinidad. Se muestran los datos de un único experimento para cada péptido.

Comprobamos que la sustitución de las dos tirosinas del ITAM  $\zeta_a$  provoca una pérdida muy notable de afinidad, a la vez que su fosforilación (Figura 17). Así mismo, también se pudo determinar de manera más cuantitativa, la diferencia en afinidad entre el péptido de CD3Z A silvestre ( $\zeta_a$  WT), y su equivalente fosforilado en tirosinas ( $\zeta_a$  P) (Figura 17C/D). Los resultados obtenidos, arrojaron una afinidad aproximadamente 10<sup>4</sup> veces menor para el péptido fosforilado (Figura 17E).

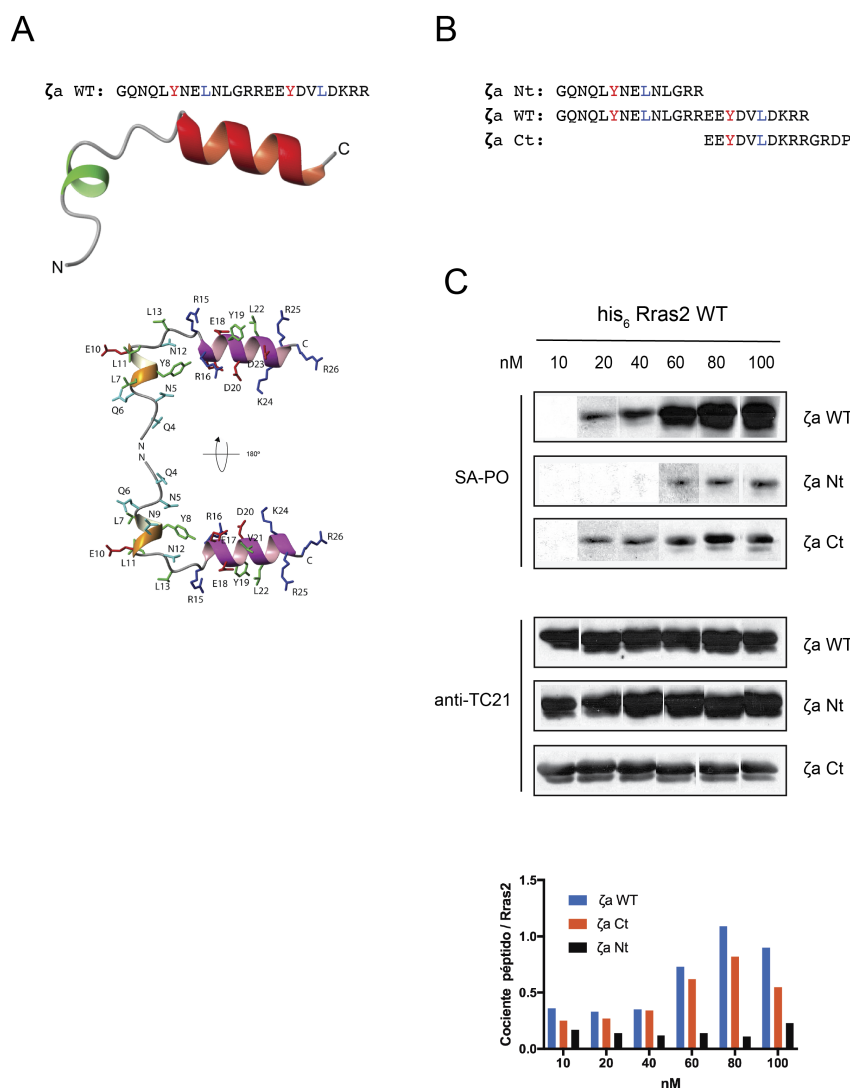


Después de comprobar el cambio drástico en afinidad que provoca la sustitución de las tirosinas, decidimos averiguar si el par de leucinas conservadas también contribuye decisivamente a la interacción. Así mismo, nos propusimos definir la contribución individual de cada tirosina, por si una tuviera más peso que la otra en la afinidad. Para ello se sintetizaron nuevos péptidos (Figura 18A), sustituyendo los residuos a estudiar por alaninas. En un ensayo de FWb, en el que se compararon los péptidos con ambos residuos mutados simultáneamente (Figura 18B), se descubrió que la mutación de ambas leucinas provoca una disminución importante en la afinidad

(Figura 18B). Por otra parte, en cuanto a la importancia de cada tirosina, se pudo apreciar que la mutación de la primera tirosina por alanina afectaba más a la interacción que la mutación de la segunda. El efecto se aprecia más claramente a la mayor concentración de péptidos utilizada (Figura 18C).

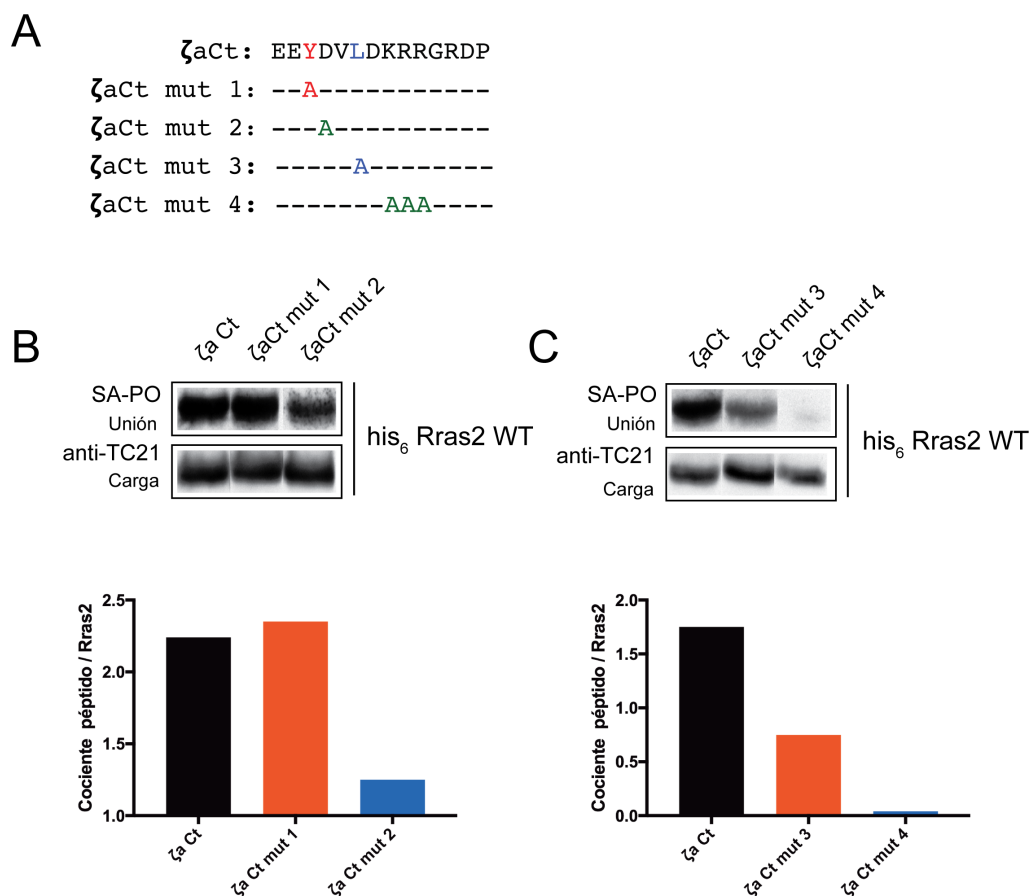
### 3. La conformación espacial de $\zeta$ a WT influye en la afinidad

El objetivo siguiente fue intentar obtener la estructura de ambas proteínas por RMN. No fue posible ni con la proteína completa RRas2 ni con el péptido correspondiente a su región HVR. Sin embargo, sí se pudo obtener la estructura del péptido  $\zeta$ a WT. En ésta, se pueden apreciar dos conformaciones helicoidales en ambos extremos del péptido (Figura 19A), aunque la hélice del extremo C-terminal es más extensa. Por otra parte, aunque la orientación entre ambas hélices no está bien definida, sí se pudo determinar la orientación de cada residuo. Con estos datos como base,



**Figura 19: RRas2 interacciona preferentemente con la secuencia más estructurada de  $\zeta$ a WT.** A) Estructura de RMN del péptido  $\zeta$ a WT. B) Alineamiento de los péptidos utilizados en el experimento. C) Far western blot con His<sub>6</sub>-RRas2 WT cargado en la membrana, y los péptidos biotinilados  $\zeta$ a WT,  $\zeta$ a Nt y  $\zeta$ a Ct a distintas concentraciones. Se muestra un experimento representativo de dos realizados.

sintetizamos nuevos péptidos para intentar delimitar residuos críticos para la interacción con RRas2; además de las tirosinas y leucinas.



**Figura 20: Residuos no conservados en todos los ITAM tienen importancia en la interacción.**

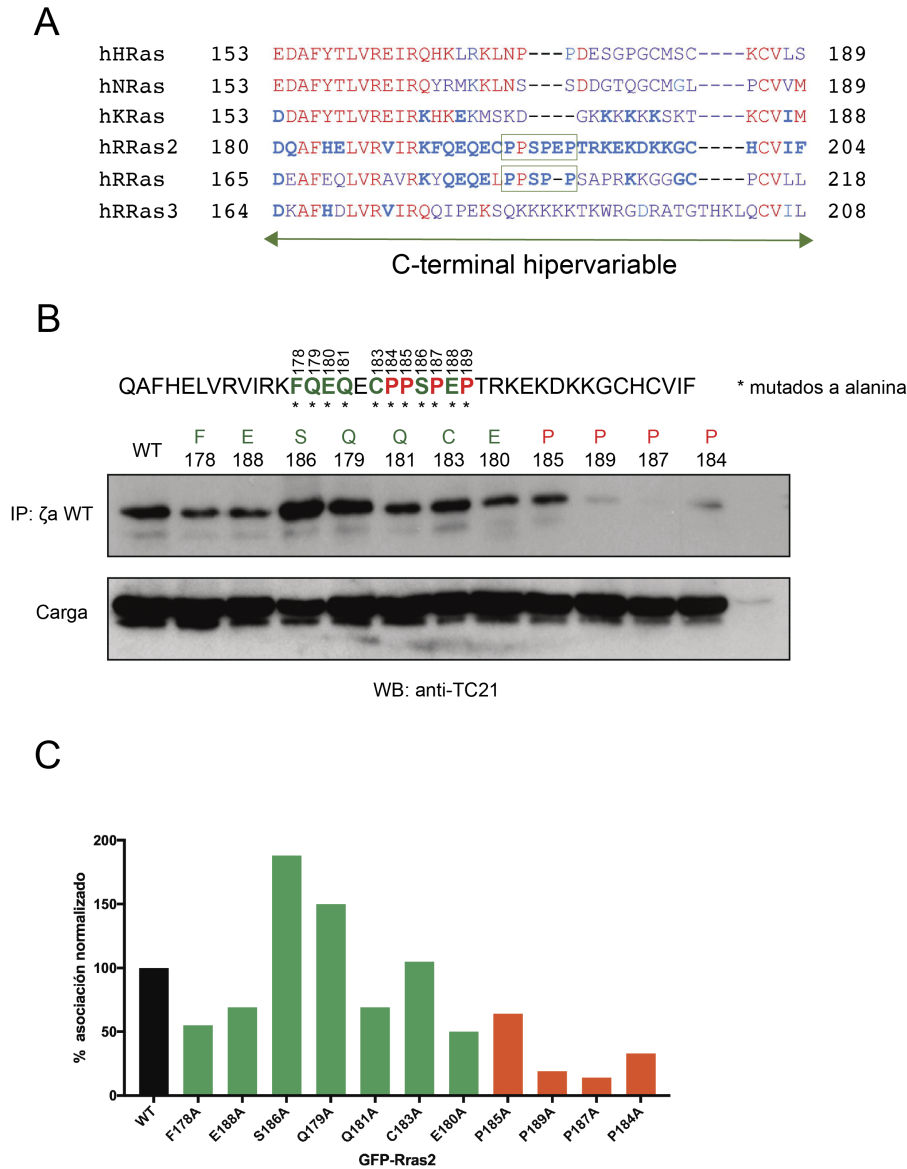
A) Péptidos utilizados en el experimento. B) Far western blot con His<sub>6</sub>-Rras2 wt cargado en la membrana y los péptidos  $\zeta$ aCt,  $\zeta$ aCt mut 1, y  $\zeta$ aCt mut 2 a una concentración de 80nM. C) Far western blot con His<sub>6</sub>-Rras2 WT cargado en la membrana, y los péptidos  $\zeta$ aCt,  $\zeta$ aCt mut 3 y  $\zeta$ aCt mut 4 todos a 80nM. Se muestran los datos de un único experimento.

En un primer momento, se sintetizaron dos nuevos péptidos a partir del  $\zeta$ a WT, que contenían una u otra hélice (N-terminal y C-terminal). Se pudo comprobar por FWb que RRas2 interacciona más fuertemente con el extremo más estructurado (C-terminal) (Figura 19B), siendo el grado de interacción similar al del ITAM completo. Por contra con el péptido N-terminal la interacción era muy baja, incluso a la máxima concentración utilizada. Teniendo ésto en cuenta, nos propusimos delimitar qué residuos contribuían en mayor medida, dentro del péptido C-terminal. Sintetizamos cuatro péptidos adicionales, con mutaciones de distintos residuos a alanina (Figura 20A). En este experimento, pudimos observar que el cambio de la tirosina conservada (péptido  $\zeta$ aCt mut1) apenas debilitaba la interacción con el péptido C-terminal original (Figura 20B), mientras que las sustituciones hechas en los péptidos  $\zeta$ aCt mut3 y  $\zeta$ aCt mut4 provocaron una disminución muy acusada de la interacción (Figura 20C). El efecto de la mutación en el péptido  $\zeta$ aCt mut1, correlaciona con el resultado de la Figura 18, en el que se muestra que la segunda tirosina del ITAM es menos relevante.



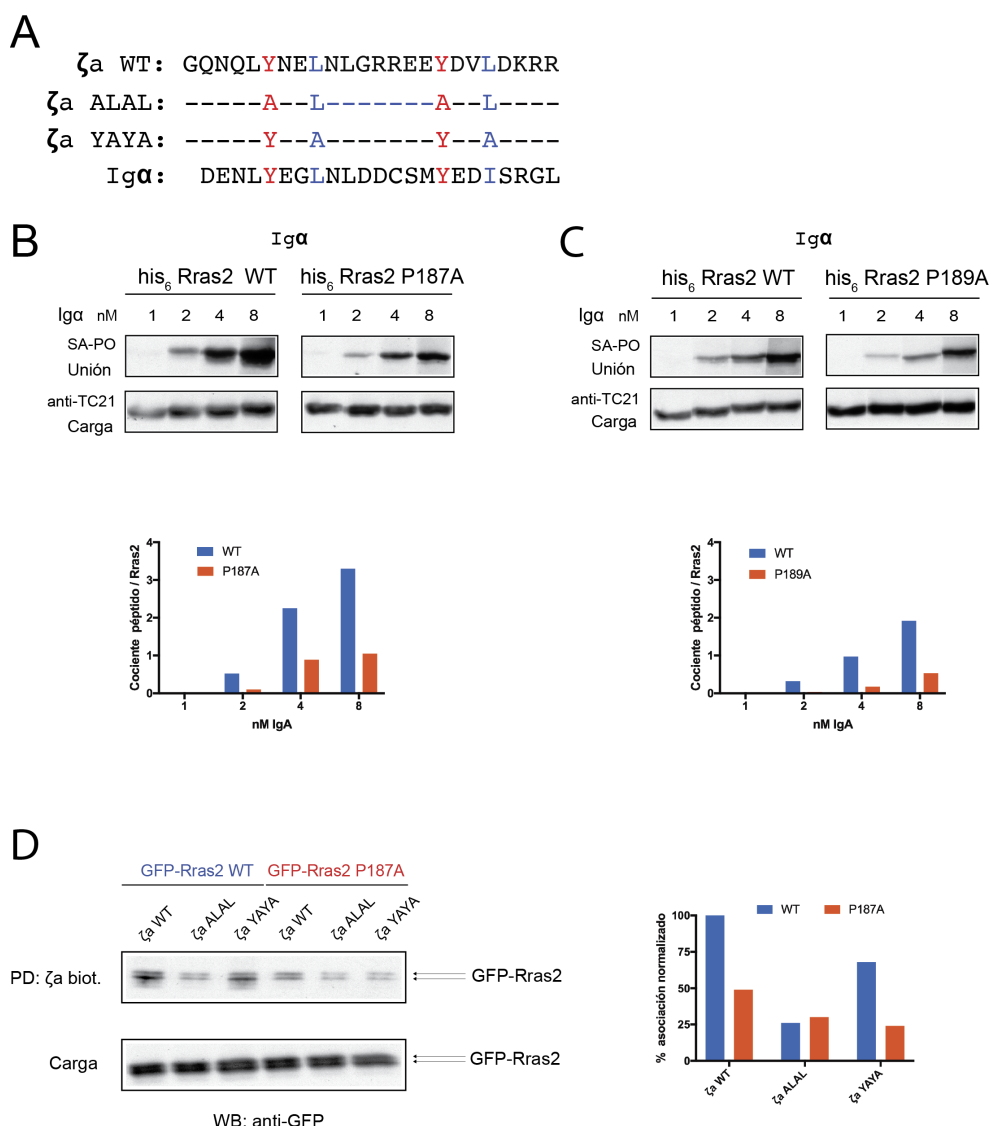
# 4. La secuencia de poli-prolina de RRas2 es fundamental para la interacción

Una vez caracterizadas las contribuciones específicas de varios residuos y regiones de  $\zeta$ a WT a la asociación con Rras2, nos propusimos averiguar cómo establece RRas2 los contactos con  $\zeta$ a WT.



**Figura 21: Residuos del HVR de RRas2 implicados en la interacción con  $\zeta$ a WT.** A) Comparación de secuencias del HVR de distintas proteínas Ras. La secuencia de poli-prolina en RRas y RRas2 está resaltada con un recuadro verde. B) Lisados de células COS-7 transfectadas transitoriamente con mutantes de GFP-RRas2 e incubados con  $1\mu\text{g}$  de péptido  $\zeta$ a WT biotinilado y conjugado a estreptavidina-sefaroza. En la parte de arriba se muestra la región HVR de RRas2 con los residuos mutados, en rojo y verde C) Densitometría de B, normalizada de acuerdo con la asociación de RRas2 WT. Tanto en B como en C los residuos en rojo son las prolinas mutadas, y en verde, el resto de residuos mutados. Se muestran datos de un único experimento.

Para ello, pusimos nuestra atención en las secuencias no conservadas entre las Ras clásicas, ya que de las proteínas de la familia Ras, únicamente RRas2 apareció en el ensayo de doble híbrido con la subunidad CD3 $\gamma$  (Delgado 2009). Una de estas regiones con mayor potencial, es la región hipervariable (Figura 21A). Dentro de ella se encuentra una secuencia de poli-prolina, además de otros residuos no conservados ácidos y básicos. Los tramos con múltiples residuos de prolina suelen favorecer la creación de plataformas de señalización para distintas moléculas (Adzhubei 2013), y por esto su prevalencia en proteínas suele ser bastante alta. Por este motivo, iniciamos la mutación de determinados residuos del HVR de RRas2, sustituyéndolos por alanina.

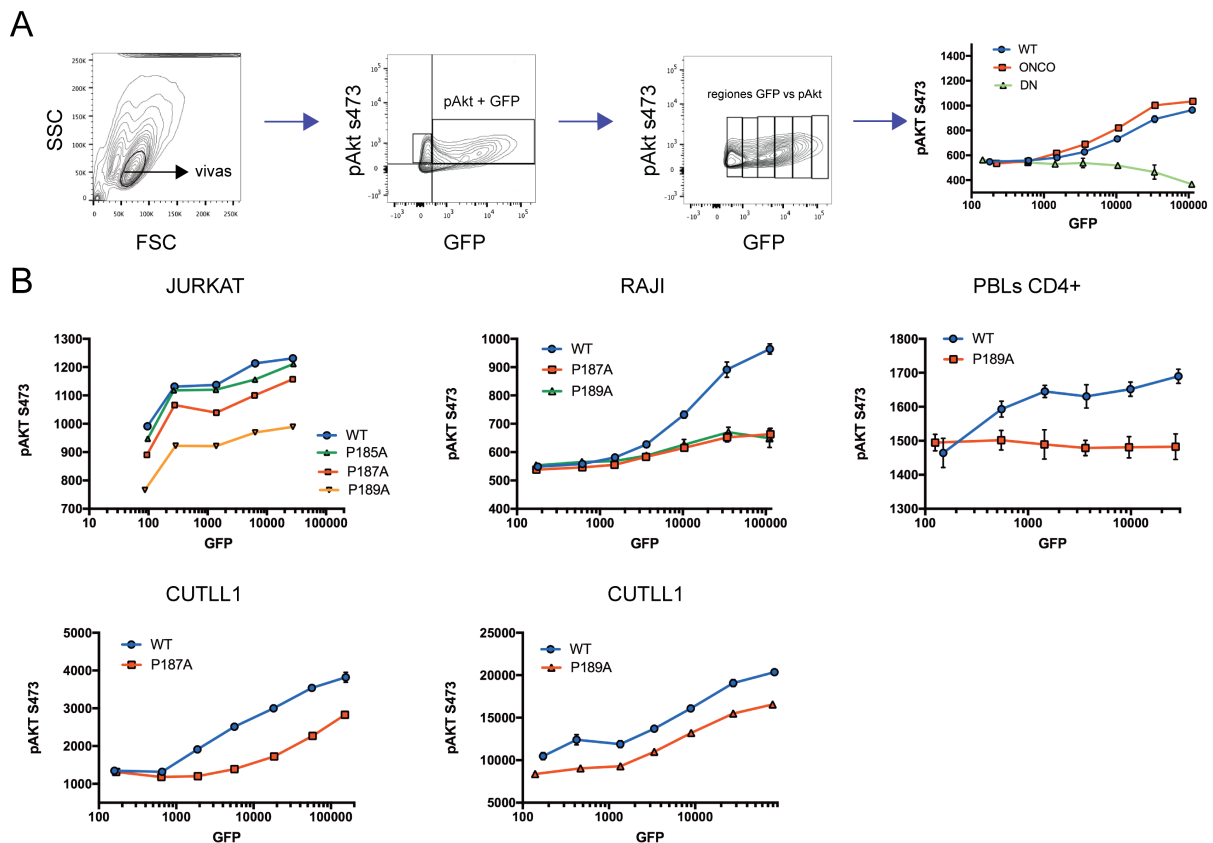


**Figura 22: Los mutantes P187A y P189A también muestran menos afinidad hacia Ig $\alpha$ .** A) Alineamiento de los péptidos utilizados. B, C) Far western blot de His<sub>6</sub>-RRas2 WT y P187A o P189A cargados en la membrana con el péptido Ig $\alpha$  a distintas concentraciones. D) Pull-Down con 1ug de péptido de  $\zeta$ a WT,  $\zeta$ a ALAL y  $\zeta$ a YAYA en lisados de células COS-7 transfectadas con las construcciones de GFP-RRas2 WT y P187A.

En un primer experimento pudimos comprobar que prácticamente todas las mutaciones tienen un efecto negativo en la interacción con  $\zeta_a$  WT (Figura 21B). Únicamente las mutaciones a alanina de la serina 186 (S186) y la glutamina 179 (Q179) parecen ejercer el efecto contrario, esto es, una mayor asociación. El efecto más notable ocurrió con las mutaciones de las prolinas, más concretamente de las prolinas 187 y 189, en donde la pérdida de asociación fué total (Figura 21B/C). En un experimento posterior, quisimos comprobar si los mutantes P187A y P189A también mostraban una menor asociación frente al péptido del ITAM de  $Ig\alpha$ , que es el que mayor afinidad posee hacia RRas2, *in vitro* (Figura 16). El resultado de un experimento de FWb con His<sub>6</sub>RRas2 wt y los mutantes P187A y P189A incubados con distintas concentraciones del péptido  $Ig\alpha$  mostró que la pérdida de afinidad, al igual que ocurre con  $\zeta_a$  WT, era muy considerable, y ocurría con ambos mutantes a un nivel similar (Figura 22B/C). Por otra parte, paralelamente a este FWb, se decidió estudiar el efecto de la mutación P187A mediante pull-down de células COS-7 transfectadas con las construcciones de GFP-RRas2 WT y P187A. Pudimos comprobar que la mutación P187A resultaba en una pérdida importante de la afinidad por  $\zeta_a$  WT, comparado con RRas2 WT (Figura 22D). Por otra parte, pudimos comprobar que el efecto de la mutación P187A en RRas2 era aditivo con el efecto de las mutaciones en tirosinas y leucinas del ITAM  $\zeta_a$ . Esto refuerza la idea de que la interacción está mediada principalmente por la región de poli-prolina en RRas2 y las tirosinas y leucinas del ITAM.

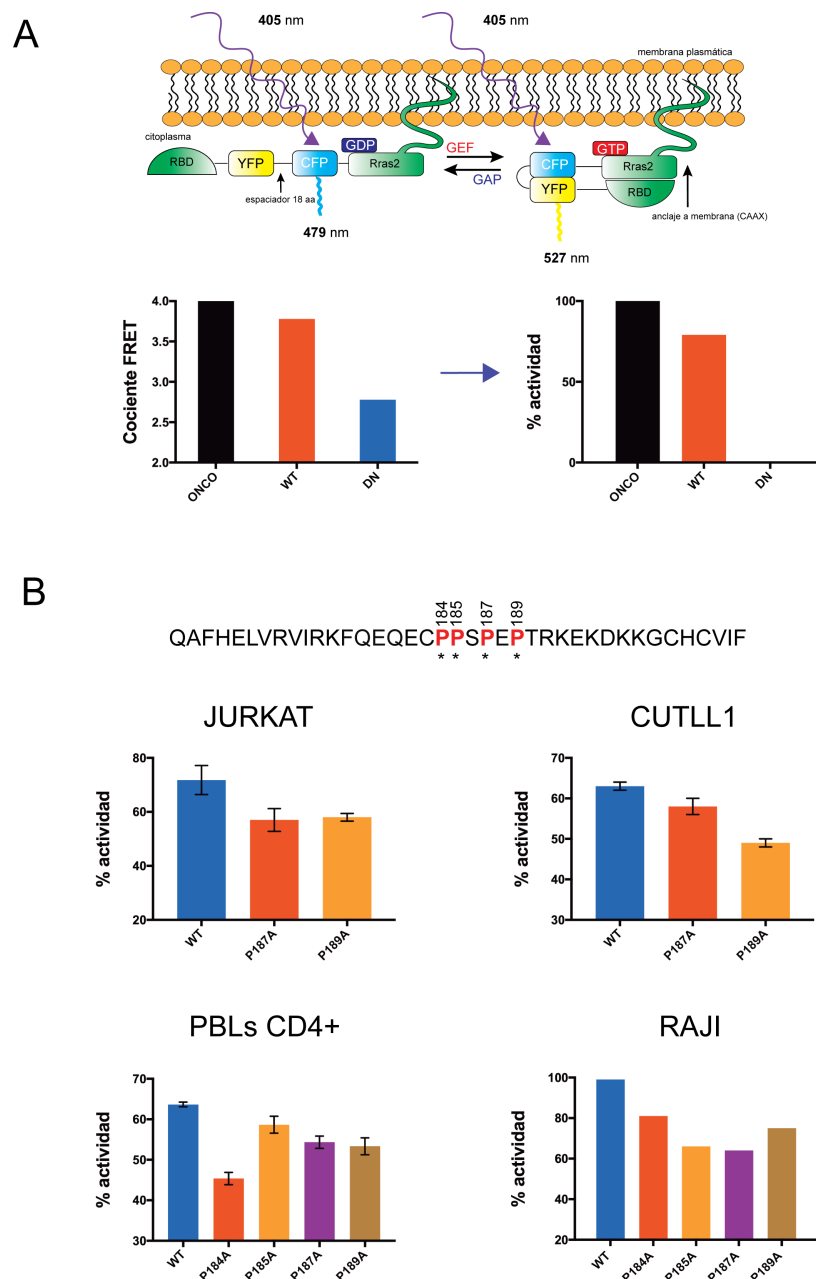
## 5. Mutaciones en la secuencia de poli-prolina reducen la actividad de RRas2

Puesto que mutaciones en la región C-terminal de RRas2, en especial la de su secuencia de poli-prolina, provocan una caída drástica en el grado de interacción con los ITAMs, nos propusimos averiguar si esta pérdida de interacción acarrea algún efecto negativo en la capacidad de RRas2 para activar las rutas de señalización en las que participa *in vivo*. Para esto, analizamos la capacidad de RRas2 para activar la vía de PI3K, midiendo la cantidad de Akt fosforilado que se genera en respuesta a su nivel de expresión (ver Medición de pAkt s473 y ppErk en células fijadas. en Materiales y Métodos). Este tipo de ensayo ya se realizó para analizar el efecto de los mutantes ONCO y DN de Rras2 en la generación de Akt fosforilado (Delgado 2009) (Figura 23A). El resultado fue, que en diversas líneas celulares T y B, así como en PBLs humanos, la mutación en particular de las prolina 187 y 189 a alanina resulta en una disminución de la generación de Akt fosforilado por parte de RRas2, lo que se traduce en una disminución de su actividad (Figura 23B).

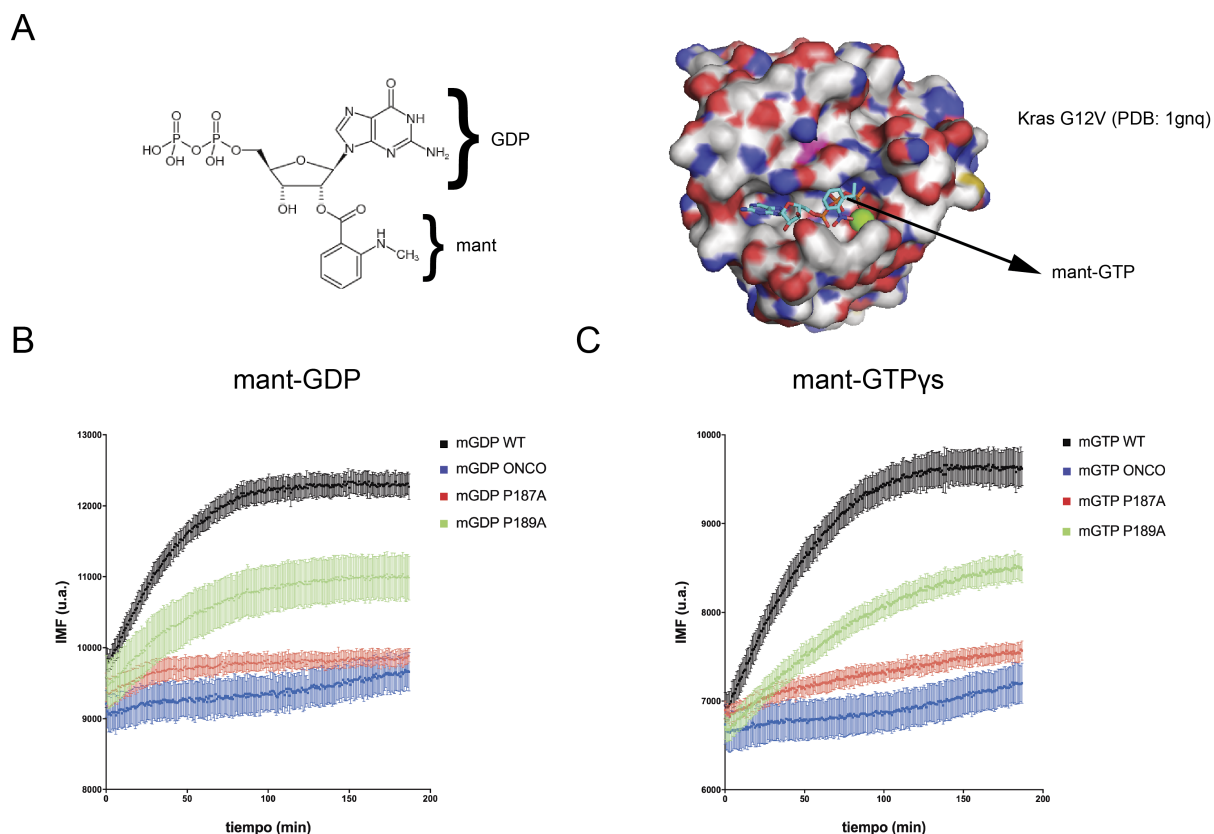


**Figura 23: Mutantes de prolina de Rras2 provocan una disminución de su actividad.** A) Esquema de un ejemplo del análisis por secciones para el ensayo de medición de Akt fosforilado. B) Relación entre la expresión de GFP-RRas2 y Akt fosforilado (S473) en distintas líneas celulares y en linfocitos CD4 primarios. Se representa la intensidad media de fluorescencia (IMF) para cada eje. Para Akt fosforilado se representa, junto con la IMF, la desviación estándar (SD). Datos representativos de cuatro experimentos.

Otro método adicional para comprobar el grado de activación de Rras2, es mediante un biosensor FRET (ver FRET en células vivas en Materiales y Métodos). En este método, se mide el grado de asociación a dominios RBD de sus efectores comunes (Figura 24A). En un experimento con los biosensores de Rras2 WT y los mutantes de prolina, se obtuvo un resultado similar al obtenido midiendo la generación de Akt fosforilado (Figura 23). Los biosensores con las construcciones mutadas en prolina mostraron todos menos FRET (actividad) que la forma silvestre (Figura 24B), lo que indica que la carga de GTP en estos es menor. Esto viene a corroborar y a ampliar los datos obtenidos midiendo Akt fosforilado.



**Figura 24: La interacción de los mutantes de prolina con el RBD de P110δ es menor.** A) Esquema del funcionamiento del biosensor FRET y cálculo del porcentaje de actividad. B) Porcentaje de actividad de cada biosensor, referido al de los mutantes ONCO y DN de RRas2, en líneas celulares y PBLs humanos CD4. En todos los casos menos para las células Raji, se muestra la desviación estándar SD de cada medida. Se muestran los datos representativos de cuatro experimentos, excepto para las células Raji, que provienen de un único experimento.

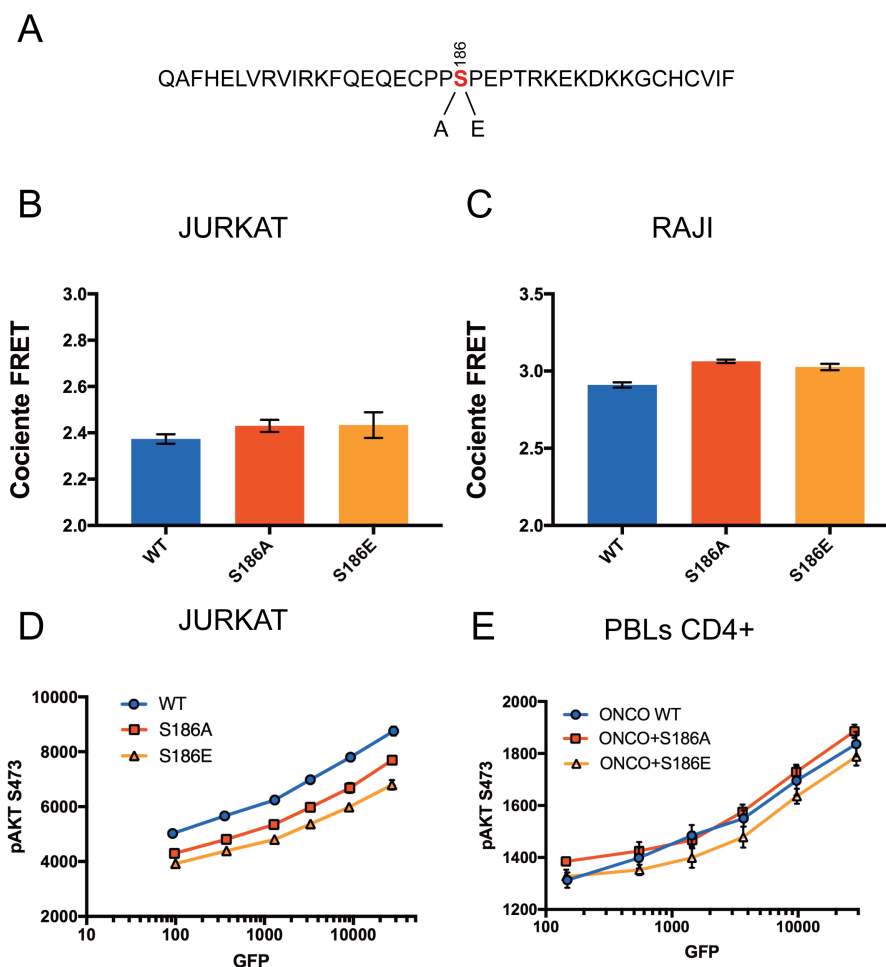


**Figura 25: El intercambio intrínseco de nucleótidos está impedido en los mutantes P187A y P189A.** A) Esquema del fluoróforo mant acoplado al anillo de ribosa del nucleótido y representación tridimensional de mant-GTP alojado en el bolsillo de KRas oncogénico. B, C) Tasa de asociación de mant-GDP y mant-GTP $\gamma$ s a distintas construcciones de His<sub>6</sub>-RRas2 medida por el aumento de fluorescencia (IMF) del fluoróforo mant. Datos representativos de tres experimentos. Se representa para la IMF, la media y SD para cada medida.

Posteriormente nos preguntamos si las mutaciones P187A y P189A además de impedir significativamente la unión de RRas2 con los ITAMs y su capacidad señalizadora, generaban alguna deficiencia el intercambio de nucleótidos. Para ésto probamos estos dos mutantes en el ensayo de incorporación de fluoróforo mant (ver Ensayos de intercambio de nucleótidos en Materiales y Métodos). Utilizando ambos tipos de nucleótido (GDP-mant y GTP $\gamma$ s-mant) (Figura 25A), pudimos comprobar que los mutantes P187A y P189A muestran claramente una menor tasa de intercambio intrínseco que RRas2 WT (Figura 25B/C). Curiosamente, la forma oncogénica también muestra un intercambio más lento. Estos datos indican que, en RRas2, la región de poli-prolina, que es distal al bolsillo de nucleótido, es imprescindible para el intercambio de nucleótidos.

La región de poli-prolina, contiene tanto en RRas como en RRas2, una serina (S186 en RRas2) cuya función no está todavía clara. En la Figura 21, la mutación a alanina de esta serina, en RRas2, provocaba una asociación con el ITAM. *In vivo*, parece ser que la fosforilación ejerce un efecto activador en la capacidad señalizadora de RRas2 y RRas, mientras que si se previene la fosforilación provoca el efecto contrario (Fremin 2016). Quisimos comprobar, de la misma manera que con los mutantes de prolina, si la

serina juega un papel determinante en la capacidad de RRas2 de activar rutas de señalización en células T y B. Para ello, además del mutante a alanina (S186A) antes mencionado, se generó otro mutante a glutámico (S186E), cuyo fin es imitar la carga negativa generada



**Figura 26: Mutaciones en la serina 186 de RRas2 no afectan a su actividad.** A) Esquema de las mutaciones realizadas. B y C) Cociente FRET de los biosensores de RRas2 WT y los mutantes S186A y S186E con P110 $\delta$ , transfectados transitoriamente en células jurkat o raji. D y E) Generación de Akt fosforilado por la transfección transitoria de los vectores en GFP, de RRas2 WT y los mutantes S186A y S186E en células Jurkat y en linfocitos de sangre periférica CD4 humanos. En todos los casos se muestra la media y SD de un experimento representativo, de dos realizados.

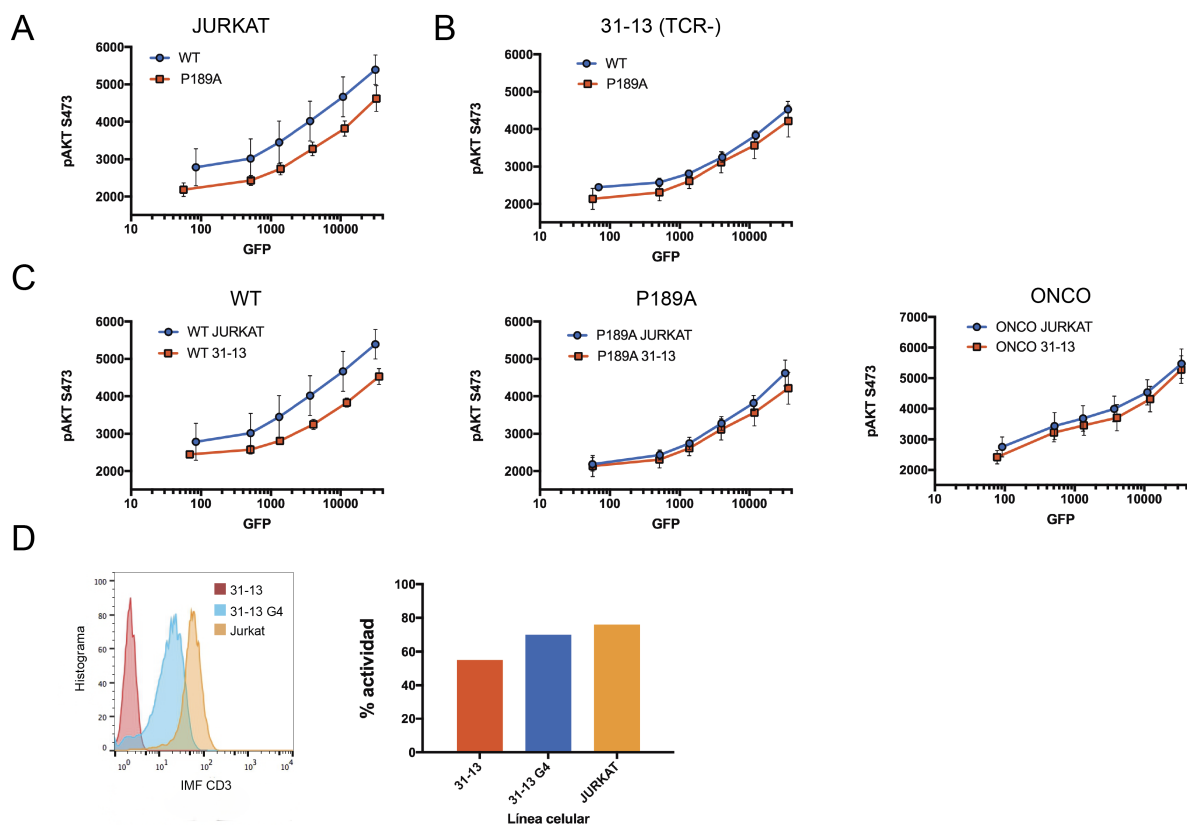
por la adición de un grupo fosfato, es decir, un mutante cuyos efectos serían los contrarios a los del mutante a alanina.

Estos mutantes generados en el vector de fusión a GFP fueron probados en diversas líneas celulares además de en linfocitos primarios CD4+. Se realizaron dos tipos de ensayo: uno de medición de Akt fosforilado (Figura 26D/E), y otro de FRET (Figura 26B/C). En ambos casos comprobamos que la expresión de ninguno de los dos mutantes parecía tener un efecto distinto al de la forma silvestre. Al menos, en lo que respecta a estos dos parámetros estudiados. Tampoco parecen tener ningún efecto adverso o

beneficioso cuando las mutaciones se realizaron en la forma oncogénica de Rras2 (Figura 26E).

## 6. La expresión del TCR en la membrana plasmática activa a Rras2

Como se ha mostrado al principio del apartado de resultados, Rras2 interacciona más favorablemente con el ITAM A de CD3 $\zeta$  cuando está cargado con GDP que cuando lo está con GTP el nucleótido alojado. Esto puede indicar que la asociación con el ITAM, ayude en el intercambio de nucleótido, y por tanto en la activación de RRas2. Partiendo de esta idea se realizaron una serie de experimentos destinados a comprobar esta hipótesis.



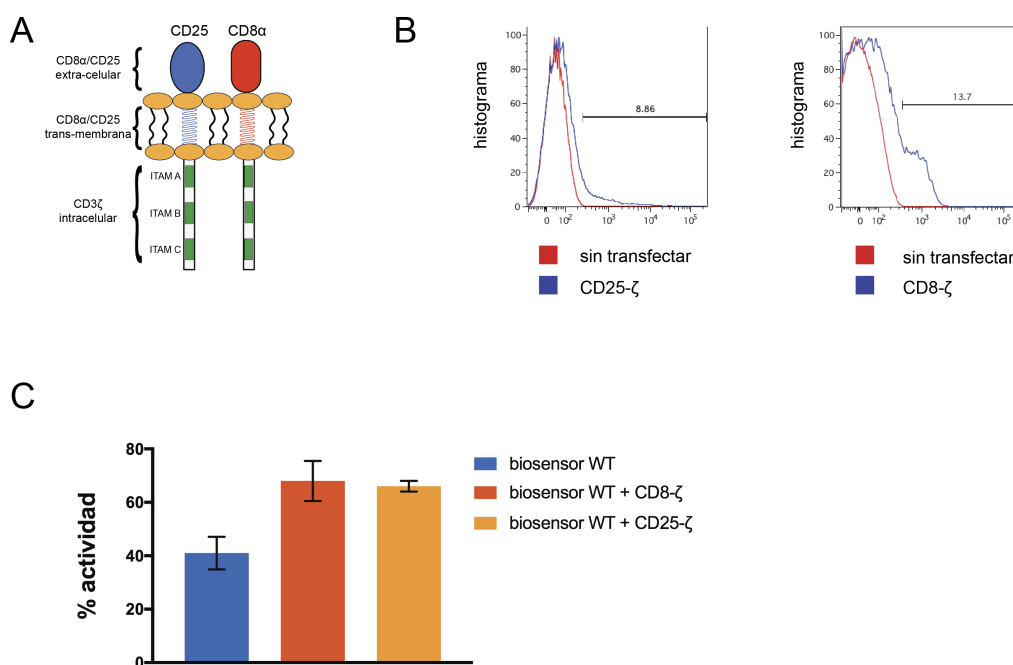
**Figura 27: La presencia del TCR en la membrana plasmática hace a Rras2 más activo.** A) Medidas de Akt fosforilado por la expresión de GFP-RRas2 WT y P189A. B) Comparación en células Jurkat 31-13 (TCR negativas) transfectadas con GFP-RRas2 wt y P189A de la generación de Akt fosforilado. C) Comparación de la capacidad de GFP-RRas2 WT, ONCO y P189A transfectadas en Jurkat y 31-13 de inducir la generación de Akt fosforilado. D) Medición del estado de activación de RRas2 WT, mediante transfección del biosensor RRas2-P110 $\delta$  en células Jurkat, 31-13 y 31-13 G4. Las células G4 es un clon de 31-13 con la expresión del TCR reconstituida. En los paneles A, B y C, se muestra la media y SD de un experimento representativo, de dos realizados. En el panel D, se muestran datos de un único experimento

En el primero de estos experimentos se utilizó una línea celular derivada de las Jurkat, la 31-13, que expresa el TCR en superficie. Transfectando GFP-RRas2 WT en

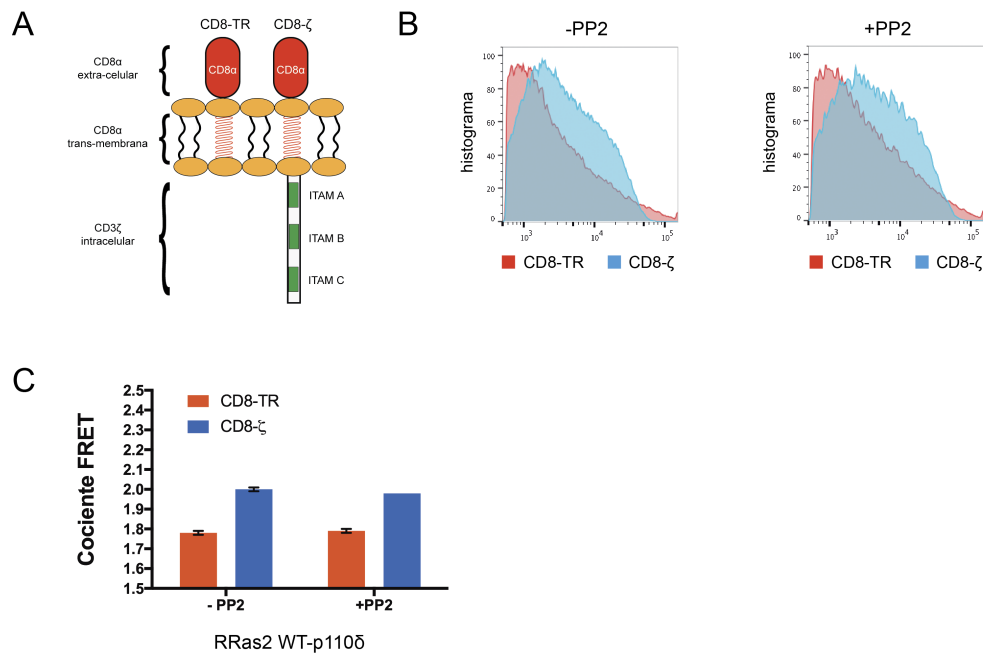


esta línea comprobamos una disminución notable de la fosforilación de Akt si se compara con la línea parental que sí expresa un TCR completo en la membrana plasmática (Figura 27C). Por el contrario, la fosforilación de Akt inducida por la sobre-expresión del mutante P189A no estaba influida por la presencia o no del TCR (Figura 27C) lo que confirma que la diferencia en actividad de GFP-RRas2 WT en células Jurkat y 31-13 se debe a la pérdida de interacción con el TCR.

En un experimento de FRET posterior se utilizó, además de la línea 31-13, un clon (G4) reconstituido con la cadena  $\beta$  del TCR y con la expresión del TCR restablecida. Utilizando las tres líneas celulares Jurkat, 31-13 y 31-13 G4 transfectadas con el biosensor de RRas2-P110 $\delta$  se pudo comprobar cómo se restablecía en gran medida la actividad perdida de RRas2 en las células 31-13 (Figura 27D). Estos datos corroboran los resultados anteriores, y reafirman la capacidad del TCR de activar *in vivo* a RRas2.



**Figura 28: RRas2 es activado por la cadena CD3 $\zeta$  del TCR.** A) Esquema de las construcciones quiméricas CD8/CD25-CD3 $\zeta$  expresadas en la membrana plasmática. B) Histograma con el grado de transfección y el nivel de expresión de cada quimera. C) Porcentaje de actividad del biosensor de RRas2 WT-p110 $\delta$ , co-expresado en células 293T junto con las quimeras CD8/CD25- CD3 $\zeta$ , o sin co-expresar. Se muestra la media y SD de un experimento representativo de dos realizados.

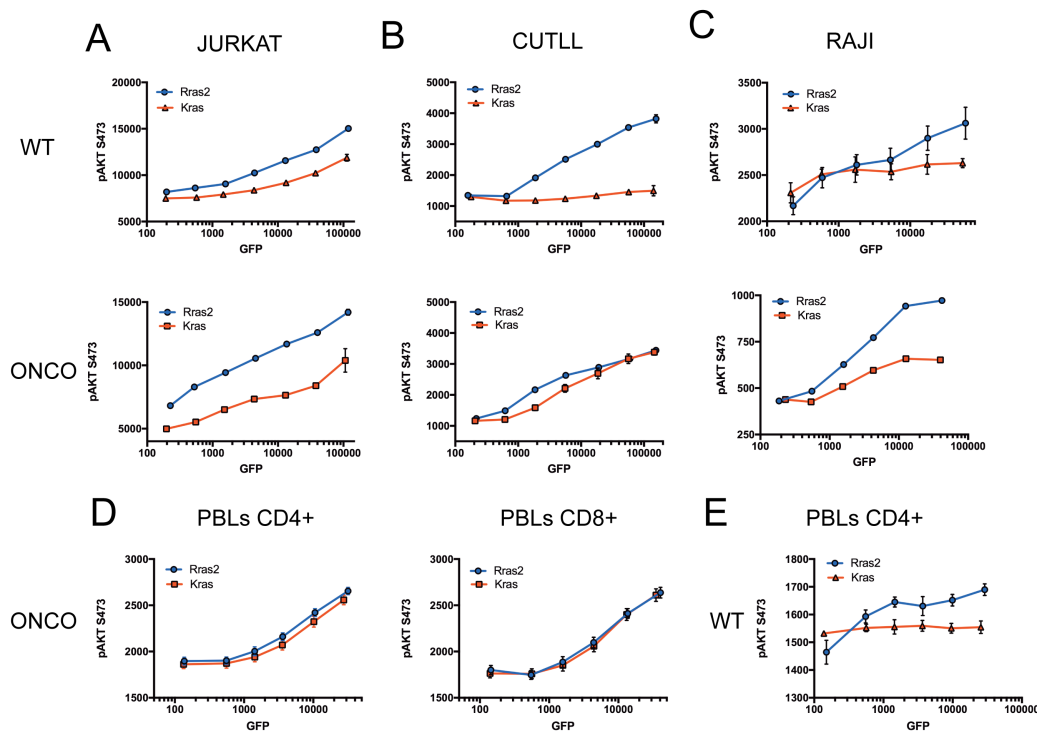


**Figura 29: CD3ζ activa a RRas2 sin necesidad de fosforilación.** A) Esquema de las quimeras CD8-TR y CD8-CD3ζ expresadas en la membrana plasmática. B) histograma que indica la expresión de cada quimera. C) cociente FRET del biosensor RRas2wt-p110δ en células 293T co-expresado con CD8-TR o CD8-CD3ζ añadiendo o sin añadir PP2 20μM. Se muestra la media y SD de un experimento representativo de tres realizados.

Posteriormente, quisimos comprobar si RRas2 también puede ser activado en células no linfoides, mediante la expresión ectópica de la cadena CD3ζ. Para esto, se transfectó el biosensor de RRas2 WT-P110δ, en células 293T junto con unas quimeras consistentes en la parte extracelular y trans-membrana de la molécula de CD8α o CD25, y la intracelular de CD3ζ (Figura 28A) y que se expresan en la membrana plasmática. La co-transfección con cualquiera de las dos quimeras (Figura 28B) produjo un aumento muy significativo en la actividad de RRas2, que se multiplicó prácticamente por dos (Figura 28C). Estos datos indican que RRas2 es capaz de ser activado por el dominio citoplásmico de CD3ζ, que contiene los tres ITAMs incluso en células no linfoides. El paso siguiente fue determinar si esta activación por parte de la quimera de CD3ζ se produce por asociación directa con RRas2. Para esto, se utilizó el inhibidor de Src-quinasas, PP2, para descartar un posible papel de estas proteínas en la activación de Rras2 por CD3ζ. Así mismo, también se utilizó la construcción “CD8-TR” que consiste únicamente del dominio extracelular y transmembrana de CD8α (Figura 29A). Así, se pudo comprobar en células 293T co-transfectadas con el biosensor de RRas2WT-P110δ y las construcciones de CD8-TR o CD8-ζ que únicamente el dominio intracelular de CD3ζ es el responsable de activar a RRas2, y que esta activación no requiere de la fosforilación de CD3ζ por parte de Src-quinasas (Figura 29C).

## 7. RRas2 es un mejor activador de la ruta de PI3K que KRas, pero peor de la ruta de Raf→Erk

Como se ha comentado la Introducción, todavía existen discrepancias sobre si RRas2 activa la ruta de señalización de Raf→Erk. Estudios previos realizados en este laboratorio, pusieron de manifiesto la importancia de la ruta de PI3K en linfocitos T para que RRas2 pudiera mantener la señalización homeostática en éstos (Delgado 2009).

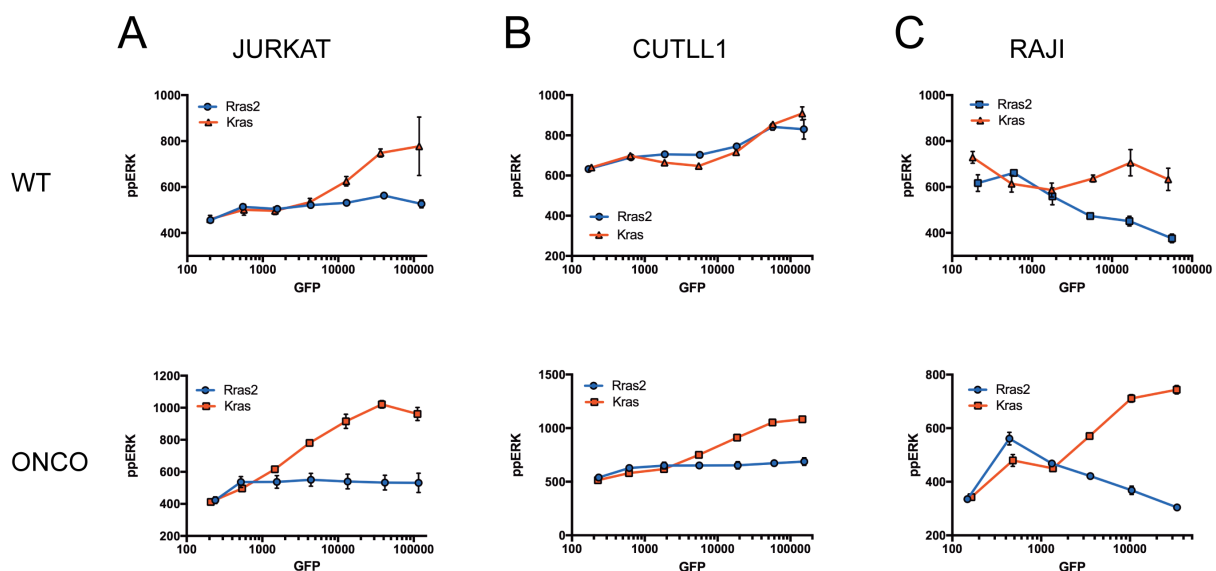


**Figura 30: RRas2 es un mejor activador de la ruta de PI3K que KRas.** A) Generación de Akt fosforilado en células Jurkat transfectadas con GFP-Rras2 y GFP-Kras en forma silvestre, o con mutaciones oncogénicas, se muestran datos representativos de cuatro experimentos. B) Generación de Akt fosforilado en células CUTLL1 transfectadas con GFP-RRas2 y GFP-KRas en forma silvestre, o con mutaciones oncogénicas, se muestran datos representativos de cuatro experimentos C) Generación de Akt fosforilado en células Raji transfectadas con GFP-RRas2 y GFP-KRas en forma silvestre, o mutados de forma oncogénica. Se muestran datos representativos de cuatro experimentos. D) Generación de Akt fosforilado en PBLs humanos CD4 y CD8, nucleofectados con las construcciones de GFP-RRas2 y GFP-KRas oncogénicos. Datos representativos de dos experimentos. E) Generación de Akt fosforilado en PBLs humanos CD4+, nucleofectados con GFP-RRas2 y GFP-KRas silvestres. Datos representativos de dos experimentos. En todos los casos, se representa, para Akt fosforilado, la media de IMF con la SD.

Quisimos averiguar si RRas2 participa igualmente en la ruta de MAPK, tal como lo hacen las Ras clásicas. Para esto comparamos RRas2 y KRas en experimentos de medición de Akt fosforilado y Erk fosforilado. En un primer experimento nos propusimos comparar RRas2 y KRas en distintas líneas celulares T y B así como en PBLs humanos. Como se puede ver en la Figura 30, la sobre-expresión de RRas2 silvestre generó más Akt fosforilado que KRas silvestre, en todos los casos. Cuando se comparan

las formas oncogénicas tanto de RRas2 y de KRas, se pudieron apreciar también diferencias notables entre ambos en células Jurkat y Raji, mientras que en las células CUTLL1, las diferencias fueron menores. Por otra parte, en PBLs ambos mutantes oncogénicos indujeron por igual la fosforilación de Akt (Figura 30D). Tomados en conjunto, estos datos indican que RRas2 es un mejor activador de la ruta de PI3K que KRas. Esto es así a pesar de que tanto las células Jurkat como las CUTLL1, poseen unos niveles basales de Akt fosforilado muy altos; debido en células Jurkat a la deficiencia en la expresión de la fosfatasa PTEN y en células CUTLL1 a la sobre-expresión de Notch, lo que provoca una reducción de la expresión de PTEN.

Habiendo comprobado que RRas2 es mejor activador de la ruta de PI3K→Akt, quisimos averiguar si se mantenía esta tendencia para Erk fosforilado también. Para esto, realizamos el mismo tipo de experimento que en la Figura 30, pero midiendo Erk doblemente fosforilado (ppErk). Como se puede apreciar en la Figura 31, RRas2 no aumentó la fosforilación de Erk ni siquiera en su forma oncogénica. Si se comparan las formas silvestres de ambas proteínas, KRas únicamente indujo la fosforilación de Erk en la línea Jurkat, mientras que en CUTLL1 y Raji, se comportó casi

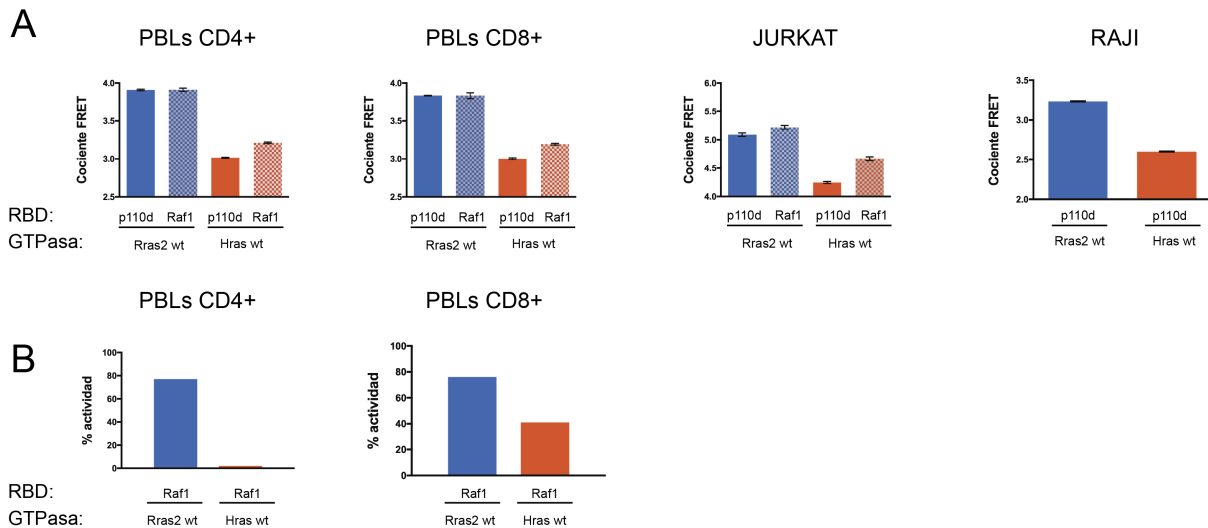


**Figura 31: RRas2 no actúa sobre la señalización de Raf→Erk.** A) Comparación de Erk fosforilado, generado mediante la transfección en células Jurkat de las construcciones GFP-RRas2 y GFP-KRas silvestres y oncogénicos. Se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. B) Comparación de Erk fosforilado, generado mediante la transfección en células CUTLL1 de las construcciones GFP-RRas2 y GFP-KRas silvestres y oncogénicos. Se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. C) Comparación de Erk fosforilado, generado mediante la transfección en células Raji de las construcciones GFP-RRas2 y GFP-KRas silvestres y oncogénicos. Se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. En todos los casos, se representa para Erk fosforilado, la IMF junto con la SD

igual que RRas2. Esto puede deberse a que KRas silvestre no esté muy activo en ausencia de estímulo. Cuando se comparan ambas formas oncogénicas KRas sí activó claramente la ruta generando Erk fosforilado, mientras que RRas2 no. Este dato pone de manifiesto que RRas2, en las líneas celulares estudiadas, únicamente actúa a través de PI3K y no a través de Raf→Erk.

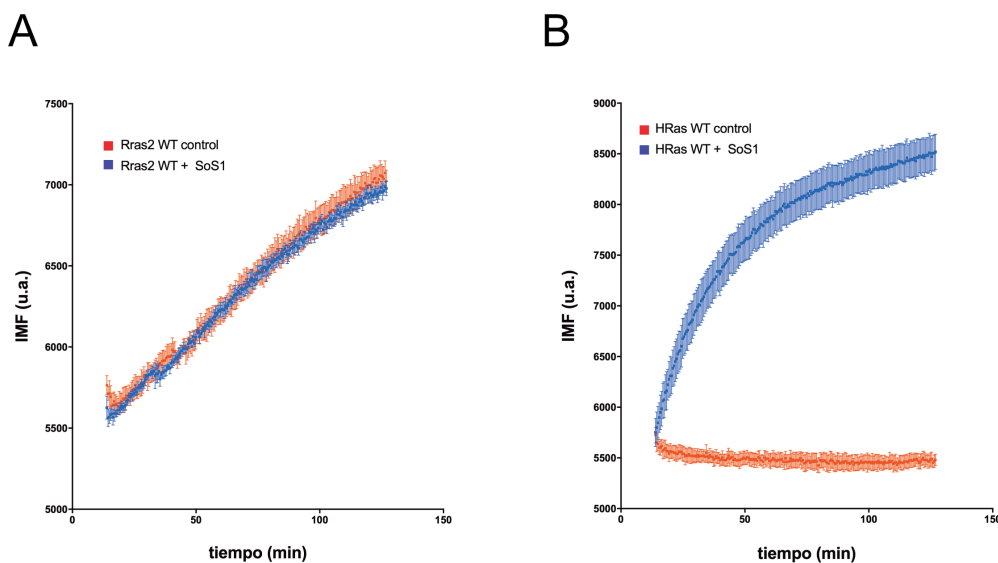
## 8. RRas2 presenta un estado basal de activación más alto que las Ras clásicas

Como se pudo apreciar en los experimentos de asociación a los ITAMs (Figura 14 y Figura 15), la afinidad de la forma silvestre y la del mutante oncogénico eran similares, lo que hacía pensar que la forma silvestre estuviera mayoritariamente unida a GTP.



**Figura 32: RRas2 adopta un estado basal más activo que HRas.** A) cociente FRET obtenido mediante la transfección en líneas celulares Jurkat y Raji, y en PBLs humanos de los biosensores de RRas2 wt y HRas wt con los RBDs de P110δ y Raf1. Se muestra la media y sd de un experimento representativo de tres realizados. B) porcentaje de actividad de los biosensores de RRas2 wt-Raf1 y HRas wt-Raf1 transfectados en PBLs humano CD4 y CD8 positivos. El 100% de actividad se refiere a la actividad de mutaciones oncogénicas y el 0% a la actividad de mutantes dominante negativos. Se muestra la una única medida de un experimento representativo de 2 realizados

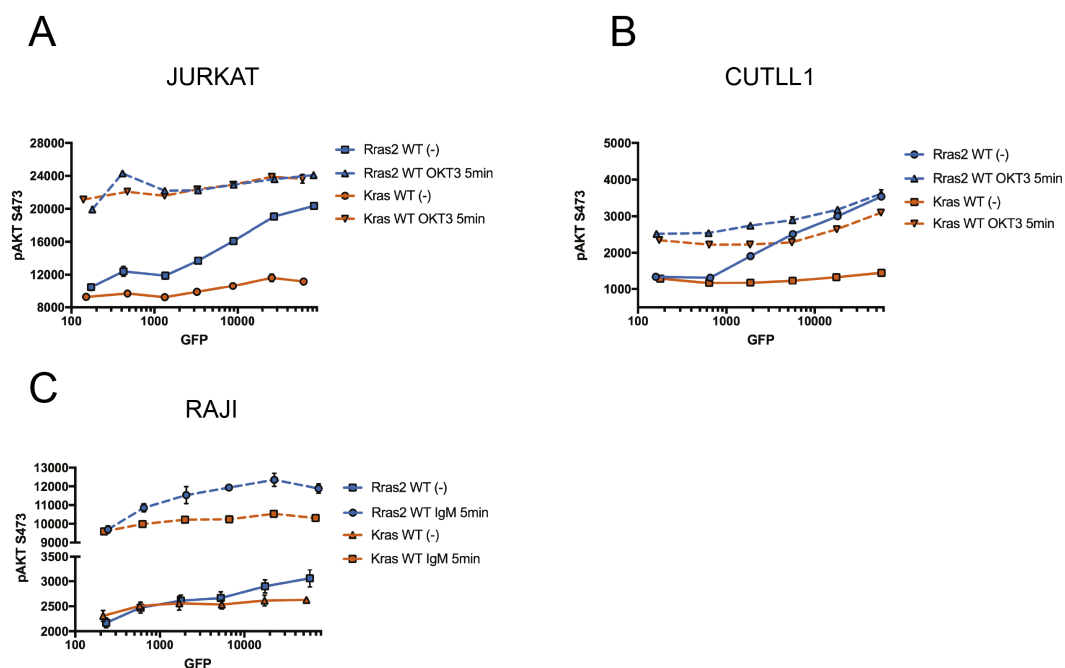
Quisimos comprobar esta hipótesis, comparando la carga de RRas2 en estado basal, con la de otra proteína de la familia Ras; en su caso HRas. En un primer experimento utilizamos los biosensores de RRas2 y Hras con los RBDs de P110δ y de Raf-1. Se puede apreciar como, independientemente del RBD utilizado, RRas2 silvestre muestra un mayor cociente FRET que la construcción correspondiente con HRas silvestre, lo que viene a confirmar que basalmente RRas2 está más activo que HRas (Figura 32). Curiosamente, mientras que el caso de RRas2 apenas existían diferencias entre los biosensores con el RBD de P110δ y de Raf1, sí la había entre los biosensores de HRas sugiriendo una predisposición de HRas para interactuar preferentemente con Raf que con PI3K (Figura 32A).



**Figura 33: SOS1 no incrementa el intercambio intrínseco de RRas2.** A) Tasa de intercambio de His<sub>6</sub>-Rras2 WT (400nM) frente a mant-GTP (400nM), tanto intrínseco como en presencia de la subunidad catalítica del GEF SOS1 (600nM). Se muestra la media y SD de un único experimento. B) Tasa de intercambio de His<sub>6</sub>-Hras WT (400nM) frente a mant-GTP hidrolizable (400nM) en ausencia o presencia de la subunidad catalítica del GEF SOS1 (600nM). Se muestra la media y SD de un único experimento.

En un experimento subsiguiente, nos propusimos medir la capacidad de intercambio de nucleótido de RRas2 y HRas, tanto intrínseco, como en presencia del GEF SOS1. Se utilizaron las proteínas recombinantes de His<sub>6</sub>-RRas2 y His<sub>6</sub>-HRas, ambas en su forma silvestre. Como se comentó en la Introducción, estudios previos mostraron que RRas2 y RRas parecen no utilizar GEFs propios de las Ras clásicas, como SOS1 (Ohba 2000). Como se puede apreciar en la Figura 33, la adición de SOS1 provocó ningún incremento en la capacidad de intercambio de RRas2 (Figura 33A), siendo ésta, ya de por sí muy alta. Por el contrario, se pudo observar (Figura 33B) que el intercambio intrínseco de HRas era nulo, mientras que necesita SOS1 producía un potente estímulo de entrada del nucleótido. Estos datos *in vitro*, refuerzan los observados anteriormente, en Ohba 2000 y en Movilla 1999.

Por otra parte, siguiendo con las comparaciones entre RRas2 y las Ras clásicas, quisimos averiguar el comportamiento de éstas en condiciones de no estimulación y de estimulación con anti-CD3 para las células T o anti-IgM para las células B. Se transfectaron las construcciones de GFP-RRas2 y GFP-KRas silvestres en líneas celulares Jurkat, CUTLL1 y Raji y se midió la capacidad de estas paa fosforilar Akt en respuesta a un estímulo del receptor. La estimulación de los receptores para antígeno incrementó hasta 4 veces la fosforilación de Akt (Figura 34). Sobre este incremento, el efecto de la sobre-expresión de RRas2 fue variable dependiendo de la línea celular pero siempre fue inferior al observado sobre células no estimuladas. Estos datos sugieren que la fosforilación de Akt llega a un nivel máximo tras la estimulación de los receptores y que los efectores “downstream” de los receptores y de RRas2 son limitantes.



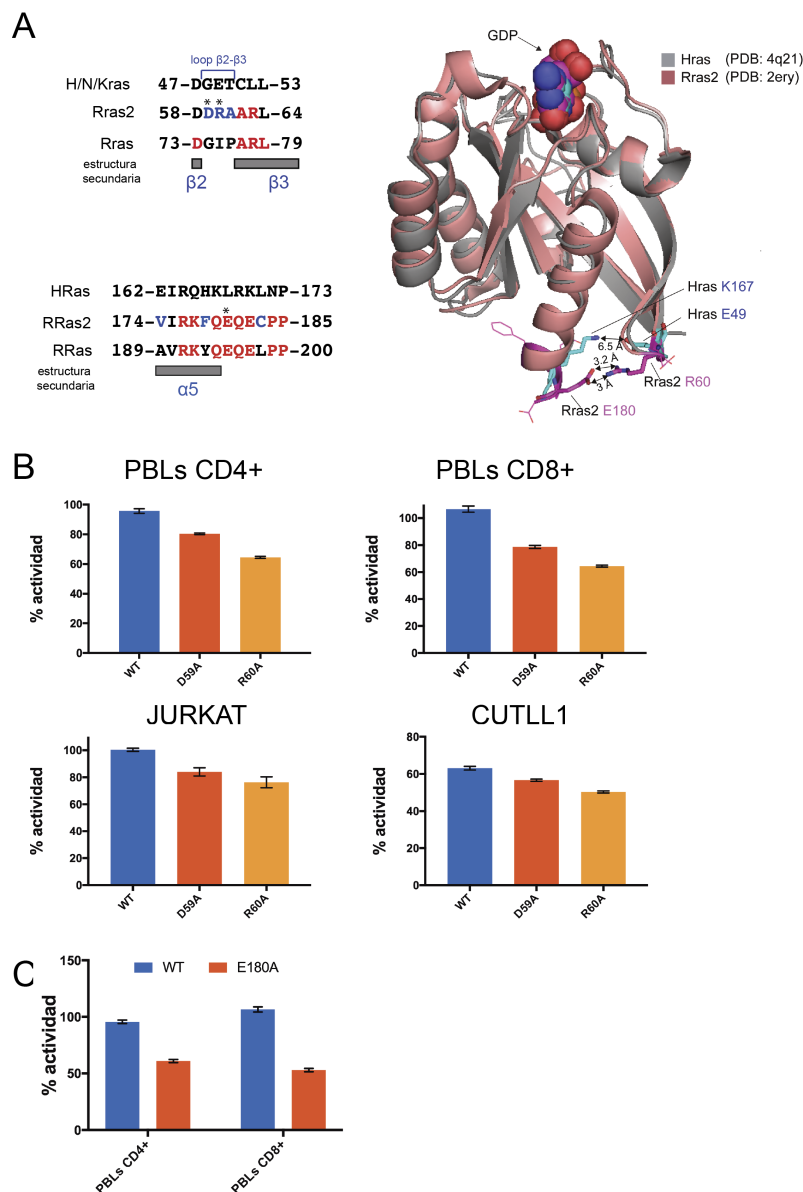
**Figura 34: La estimulación del receptor ejerce distintos efectos en la capacidad de RRas2 de generar Akt fosforilado.** A) Medición de Akt fosforilado en células Jurkat transfectadas con GFP-RRas2 wt o GFP-KRas wt, estimuladas o no con OKT3 10µg/ml durante 5 minutos. Se muestra la IMF y SD para cada punto de un experimento representativo de tres realizados. B) Medición de Akt fosforilado en células Raji transfectadas con GFP-RRas2 wt o GFP-KRas wt, estimuladas o no con anti-IgM 10µg/ml durante 5 minutos. Se muestra la IMF y SD para cada punto, de un experimento representativo de tres realizados. C) Medición de Akt fosforilado en células CUTLL1 transfectadas con GFP-RRas2 WT o GFP-KRas WT, estimuladas o no con OKT3 10µg/ml durante 5 minutos. Se muestra la IMF y SD para cada punto, excepto en el caso de KRas+anti-IgM (una sola medida), de un experimento representativo de tres realizados.

## 9. Mutaciones en el loop $\beta 2$ - $\beta 3$ de Rras2, también resultan en una disminución de su actividad

Además de la región C-terminal, que es donde se concentra la mayor diversidad de secuencia entre los miembros de la familia Ras, existe otra secuencia de aminoácidos no conservados entre la familia de RRas y las Ras clásicas, situada en el bucle  $\beta 2$ - $\beta 3$  entre los dominios Switch I y Switch II. Este bucle participa, junto con residuos del HVR, en la reorientación dependiente de nucleótido de Ras en la membrana plasmática. Lo que lo predispone para la interacción favorable con sus efectores (Abankwa 2008, Blazejvits 2016).

Nos propusimos, al igual que con la región de poli-prolina, comprobar si mutaciones de residuos situados en estas dos zonas tienen efecto sobre la capacidad de RRas2 de activar la ruta de PI3K y de unirse a sus efectores. Con este fin, generamos el mutante E180A, que ya se utilizó anteriormente en el ensayo de unión al péptido  $\zeta$ a WT (Figura 21), para el biosensor FRET. Dada la posición relativa del loop  $\beta 2$ - $\beta 3$  y el HVR en la estructura tridimensional de RRas2, se puede intuir el establecimiento de un puente salino entre la R60 y el E180, debido a su orientación relativa y a su proximidad

(Figura 35A). Esta interacción, de producirse, podría constituir un canal de comunicación entre el HVR y el sitio catalítico.



**Figura 35: Mutaciones a alanina en el bucle  $\beta 2$ - $\beta 3$  de RRas2, provocan una disminución de su estado activo.** A) Alineación de la secuencia del bucle  $\beta 2$ - $\beta 3$  y de la hélice  $\alpha 5$  en distintas proteínas Ras, el asterisco muestra los aminoácidos que han sido mutados a alanina. A la derecha, superposición de las estructuras tridimensionales de HRas y RRas2 silvestres cargados con GDP. Se muestra la distancia en nanómetros entre las parejas de residuos resaltados en rojo (RRas2) y azul (HRas). B) Porcentaje de actividad de los biosensores de RRas2 WT y los mutantes D59A y R60A, unidos al RBD de P110 $\delta$ , en distintos tipos celulares. C) Comparativa del porcentaje de actividad de los biosensores de RRas2 wt y el mutante E180A con el RBD de P110 $\delta$  en PBLs humanos CD4 y CD8 positivos. En B, se muestra la media y SD de un experimento representativo de cinco realizados. En el panel C se muestra la media y SD de un único experimento.

En el panel A de la Figura 35, se puede comprobar la no conservación de la secuencia en otros miembros de Ras. Así mismo, también se muestra parte de la



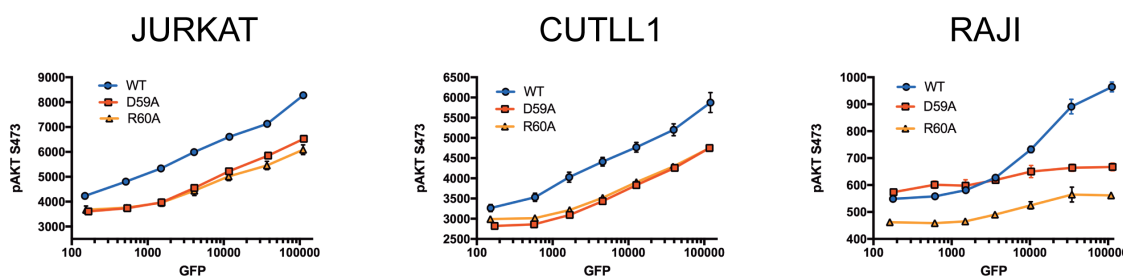
secuencia de aminoácidos del HVR. En la estructura tridimensional de RRas2 se pueden apreciar la proximidad de ambos residuos (magenta). En HRas, en cambio, los residuos equivalentes (azul), están considerablemente más alejados entre sí (Figura 35A).

En una primera tanda de experimentos comprobamos que los mutantes D59A y R60A resultan en pérdida de actividad del biosensor en especial en linfocitos T primarios. Por otra parte, se comprobó el efecto de la mutación E180A en el HVR de RRas2. Esta mutación también producía una disminución marcada del porcentaje de actividad medido por FRET (Figura 35C) en los linfocitos T primarios.

En cuanto de inducir la fosforilación de Akt, los mutantes D59A y R60A, mostraron una capacidad considerablemente menor que la de Rras2 silvestre (Figura 36). Por otra parte, se comportan de manera idéntica excepto en las células Raji, en las que el mutante R60A genera todavía menos Akt fosforilado que el mutante D59A (Figura 36). Este mayor efecto del mutante R60A en la fosforilación de Akt correlaciona con el efecto en los ensayos de FRET (Figura 35B).

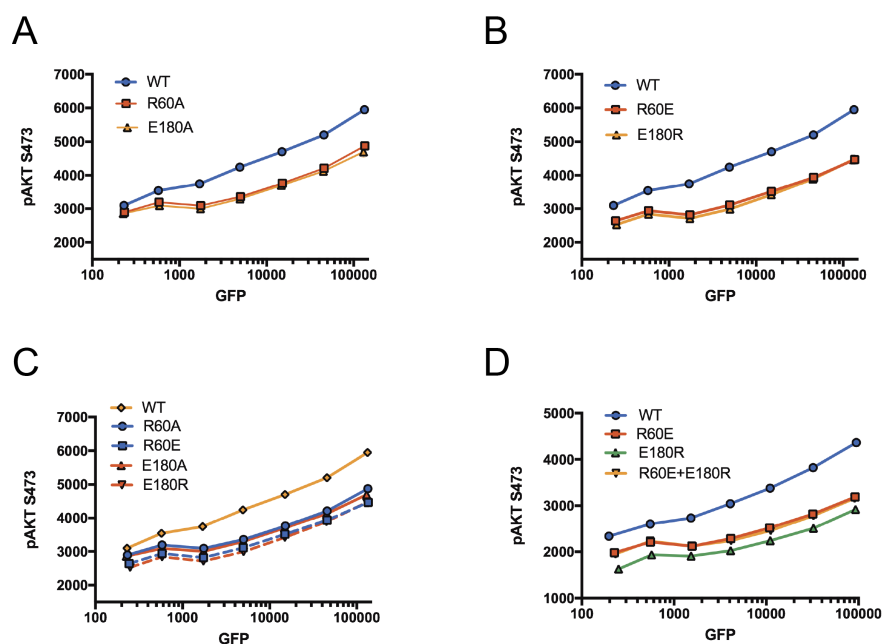
Como se comentó anteriormente, quisimos probar una posible interacción funcional entre la R60 y el E180, dos residuos muy distanciados en la secuencia de aminoácidos, pero muy cerca en la proteína plegada. En primer lugar, realizamos una serie de mutaciones simples sustituyendo el aminoácido por el correspondiente al de la

A



**Figura 36: Los mutantes del giro  $\beta 2$ - $\beta 3$  de Rras2 D59A y R60A también generan menos Akt fosforilado que la forma silvestre.** A) Generación de Akt fosforilado en distintas líneas celulares transfectadas con las construcciones en GFP de Rras2 wt y los mutantes D59A y R60A. Se muestra la media y SD de un experimento representativo, de cuatro realizados.

pareja con que supuestamente interaccionaría; esto es: R60E y E180R. Como se puede apreciar en la Figura 37 B/C, estas mutaciones son idénticas a las mutaciones originales a alanina, en cuanto a su capacidad de generar Akt fosforilado. Esto es un dato interesante, ya que se cambió la carga del aminoácido, por la opuesta, y el resultado fue el mismo. Esto es indicativo de que tanto R60 como E180 podrían establecer interacciones con aminoácidos concretos, de carácter electrostático. Sin embargo, cuando se realizaron las mutaciones dobles (R60E+E180R), para restablecer la interacción entre ambos residuos, esta no se produce (Figura 37D).



**Figura 37: La doble sustitución de los residuos R60 del giro  $\beta 2-\beta 3$  y E180 del HVR no restablece la actividad.** A) Medida de Akt fosforilado en células Jurkat transfectadas con las construcciones de GFP-RRas2 WT, R60A y E180A. B) Generación de Akt fosforilado por GFP-RRas2 WT, R60E, E180R transfectados en células Jurkat. C) Medida de Akt fosforilado de los mutantes GFP-RRas2 R60A, R60E, E180A y E180R transfectados en células Jurkat. D) Medida de Akt fosforilado por la transfección en células Jurkat de GFP-RRas2 WT, R60E, E180R y el doble mutante R60E+E180R. En los cuatro casos se representa la media y SD de un experimento representativo de dos realizados.

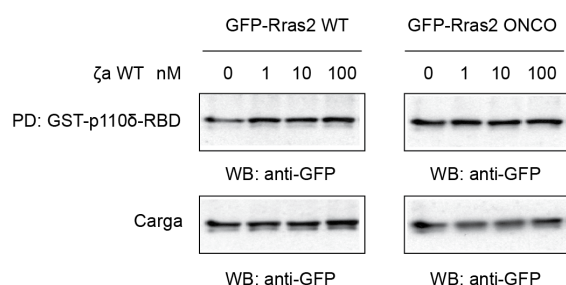
## 10. El ITAM $\zeta$ a activa *in-vitro* a RRas2 y promueve la apertura del bolsillo de nucleótido.

Habiendo demostrado que RRas2 es capaz de ser activado *in vivo* por la expresión de quimeras conteniendo el tallo citoplásmico de CD3 $\zeta$  en células no linfoides (Figura 28 y Figura 29), quisimos averiguar si el ITAM  $\zeta$ a es capaz de activar *in vitro* a RRas2 induciendo la unión del RBD de Raf1 (GST-Raf1 RBD) o el de p110 $\delta$  (GST-p110 $\delta$  RBD), que reconocen únicamente la forma activa de RRas2. Para esto hicimos un ensayo de “pull-down” a partir de lisados de células 293T transfectadas con la construcción de GFP-RRas2.

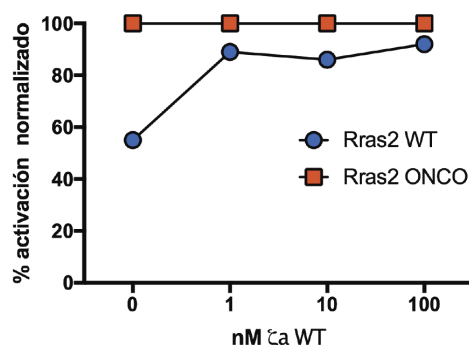
En una primera aproximación, se comparó el comportamiento de RRas2 wt y RRas2 oncogénico frente al ITAM  $\zeta$ a WT, usando el RBD de p110 $\delta$  (Figura 38A). La presencia de  $\zeta$ a WT la afinidad de RRas2 WT por el RBD (su activación) desde la concentración más baja de péptido (1nM), consiguiéndose un incremento de aproximadamente el doble en la unión al RBD; incremento que se mantuvo sin cambios

al aumentar la concentración del ITAM. Por el contrario, el mutante oncogénico de RRas2 no vio aumentada su actividad en presencia del ITAM a ninguna de sus

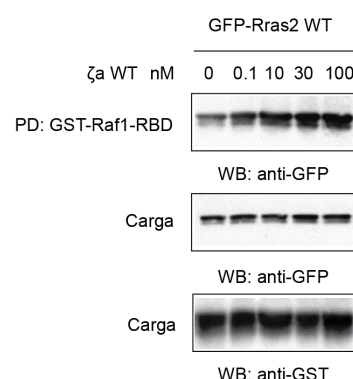
**A**



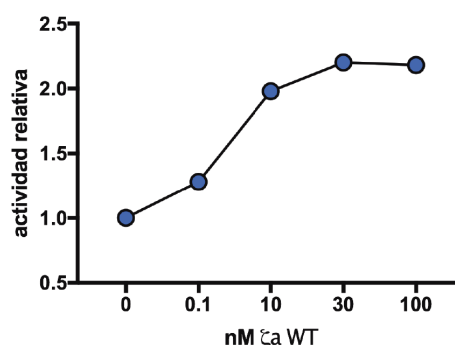
Cociente PD/Carga GFP



**B**



Cociente PD/Carga GFP

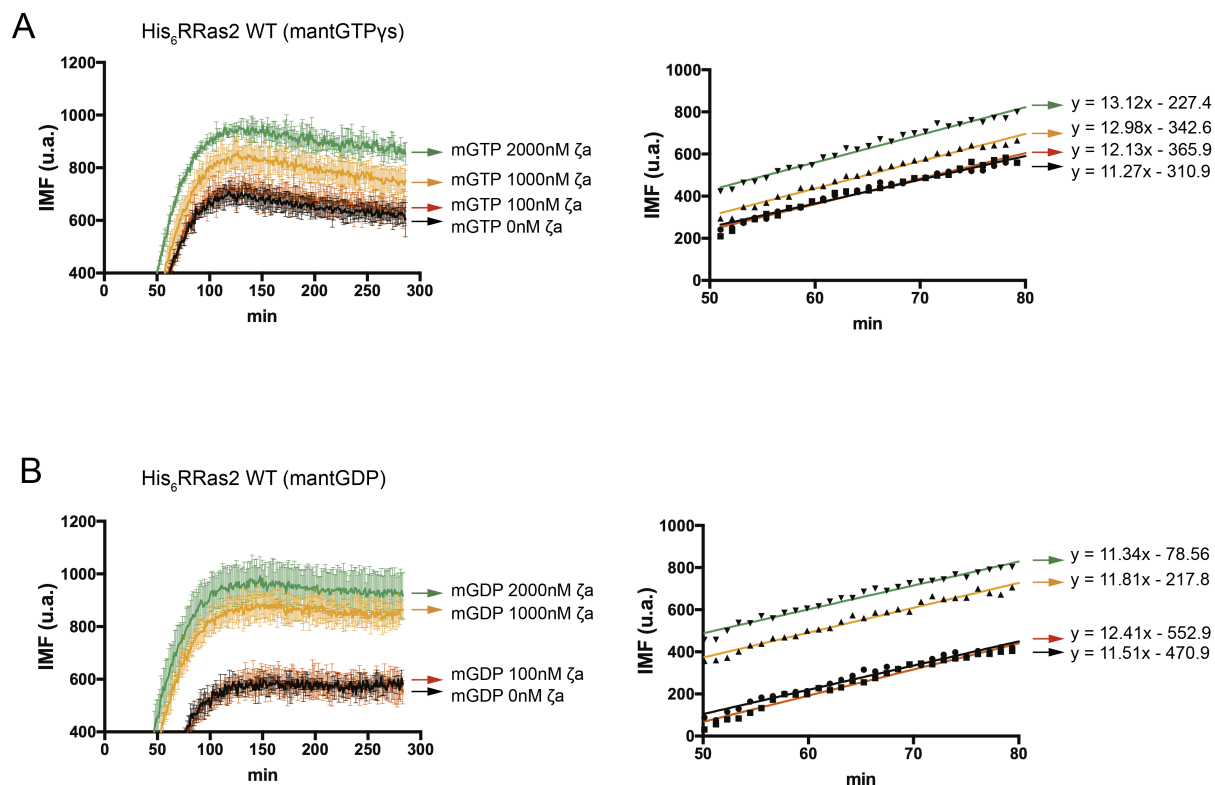


**Figura 38: El ITAM A de CD3ζ es capaz de activar *in vitro* a RRas2.** A) Pull-down con GST-p110δ a partir de lisados de células 293T transfectados con GFP-RRas2 WT y un mutante oncogénico (onco) e incubados con péptido ITAM ζa. En la parte inferior se muestra la densitometría del western-blot. B) Pull-down con GST-Raf1 RBD a partir de lisados de células 293T transfectadas con GFP-RRas2 WT e incubadas con péptido ITAM ζa. En la parte inferior se muestra el cociente del análisis densitométrico.

concentraciones (Figura 38A).

Del mismo modo, cuando se utilizó el RBD de Raf1, también se pudo apreciar que la asociación del ITAM ζa a RRas2 WT promueve su activación y unión al RBD. En este caso se puede apreciar una dosis-respuesta en función de la concentración de péptido (Figura 38B), alcanzándose el máximo de activación a una concentración de ITAM ζa de aproximadamente 30nM. Al igual que con el RBD de p110δ, el ITAM consiguió multiplicar por dos, aproximadamente, el porcentaje de unión al RBD de Raf1 (Figura 38B).

Por otra parte, en un ensayo de intercambio con nucleótidos GDP y GTP unidos al fluoróforo mant, se observó que el péptido del ITAM ζa WT provocaba que un mayor número de moléculas de RRas2 intercambiaran nucleótido, aunque no provocó un aumento perceptible en la tasa de intercambio (Figura 39C). El ITAM ζa parece actuar como un GEF, al favorecer la apertura del bolsillo de nucleótido, independientemente de que éste sea GDP o GTP (Figura 39A/B).



**Figura 39: El ITAM  $\zeta_a$  WT promueve el intercambio *in vitro* de nucleótido en RRas2.** A) Cinética de entrada de mantGTPγs en His<sub>6</sub>RRas2 WT en presencia de concentraciones crecientes de péptido  $\zeta_a$  WT. A su derecha se representa el ajuste lineal de la primera parte de la cinética. B) Cinética de entrada de mantGDP en His<sub>6</sub>RRas2 WT en presencia de concentraciones crecientes de péptido  $\zeta_a$  WT. A su derecha se representa el ajuste lineal de la primera parte de la cinética. Para ambas cinéticas se muestra la intensidad media de fluorescencia de mant (IMF) y la SD de un experimento representativo de cuatro realizados.

## DISCUSIÓN

### 1. RRas2 interacciona y es activado por el ITAM $\zeta\alpha$

RRas2 ha suscitó bastante interés tras su descubrimiento, ya que su capacidad transformadora era pareja o incluso superior, a la de las Ras “clásicas”. Sin embargo, el hecho de que no se descubriera a RRas2 mutado de forma oncogénica en un número relevante de muestras de tumores hizo que se diluyera su interés por él. Por otro lado, ninguna de estas investigaciones ha tenido como objeto su estudio en células del sistema inmune. El descubrimiento en este laboratorio de la asociación de RRas2 a las cadenas del complejo CD3 del TCR promovió la creación de una línea de investigación dedicada a averiguar una posible relación funcional entre RRas2 y los receptores de antígeno. Esta relación podría suponer un nuevo modo de regulación, exclusivo de esta GTPasa, en el que RRas2 podría ejercer un papel preponderante en el sistema inmune, dentro de la familia Ras. Cuando se descubrió que RRas2 se asociaba más fuertemente al ITAM  $\zeta\alpha$  en su forma inactiva (unido a GDP) y que al unir GTP la asociación disminuía 10 veces aproximadamente, la primera idea que nos surgió, fue la de que la interacción con el ITAM podría estar promoviendo el intercambio de nucleótidos. Esta idea viene reforzada por el hecho de que los otros dos ITAMs estudiados en este trabajo, Ig $\alpha$  e Ig $\beta$ , también tiene preferencia por RRas2 unido a GDP.

El propósito central de este trabajo, ha sido intentar relacionar la asociación diferencial de RRas2 al TCR, según la carga de nucleótido, con un efecto en la actividad. A este respecto, existe un efecto claro de activación de Rras2 en presencia de la cadena CD3 $\zeta$  del TCR, que es propiciada por la asociación directa de RRas2 a ésta. El modelo derivado del estudio presente es el de que el TCR (el BCR posiblemente también) actúa a modo de GEF, favoreciendo la activación de RRas2. Esta idea está soportada por el hecho de que el ITAM favorece el intercambio de nucleótido *in vitro*, ya sea GDP o GTP, por RRas2. Por otra parte, el receptor de antígeno no es el único regulador de la actividad de RRas2 en linfocitos T y B ya que, en ausencia de TCR, RRas2 mantiene una actividad basal, debida a su alto intercambio intrínseco, y a GEFs como RasGRP que actúan sobre él. Sin embargo, es un hecho reseñable que la secuencia de poli-prolina de RRas2, sólo está presente en vertebrados (Figura 40), lo que podría sugerir una función concreta de ésta en el sistema inmune adaptativo.

Sin disponer de datos estructurales de la secuencia completa de RRas2 cargado con GDP y GTP es difícil saber cómo actúa el HVR de RRas2 para que al unirse al ITAM, traslade ese contacto al bolsillo de nucleótido. A este respecto ya existen antecedentes que investigan el papel del HVR en la regulación del sitio catalítico: resultados obtenidos mediante técnicas biofísicas y de RMN, indican que cuando KRas 4B está unido a GDP, el HVR se pliega sobre el sitio catalítico, ocluyéndolo

#### Vertebrados:

166-QAFHELVRVIRKFQEQECPPSPEPTRKEKDKKGCHCVIF-204	<i>Homo sapiens</i>
166-QAFHELVRVIRKFQEQECPPSPEPTRKEKDKKGCHCVIF-204	<i>Pan troglodytes</i>
166-QAFHELVRVIRKFQEQECPPSPEPTRKEKDKKGCHCVIF-204	<i>Mus musculus</i>
154-QAFHELVRVIRKFQEQECPPSPEPTRKEKDKKGCHCVIF-192	<i>Taeniopygia guttata</i> (ave)
164-QAFHELVRVIRKFQEQECPPSPEPTRKEKDKSGCHCVIF-202	<i>Danio rerio</i> (pez cebra)
164-QAFHELVRVIRKFQEQECPPSPEPTRKEKDKSGCHCVI -201	<i>K. marmoratus</i> (pez)
155-QAFHELVRVIRKFQEQECPPSPEPKSKEKDKSGCHCVI -193	<i>Tetraodon nigroviridis</i> (pez)
180-QAFHELVRVIRKFQEQESPPSPEPTRKEKDKKGCHCVV -217	<i>Xenopus laevis</i>

#### Tunicados

161-QAFYDLVRSIREFQKY- - -PEPQNTGTPDKKRCCTVL-195	<i>Ciona intestinales</i>
---	---------------------------

#### Artrópodos:

169-QAFHELVRIVRKFLSERPP-LKPNYK-KNKKCCHCVV -204	<i>Nasonia vitripennis</i> (insecto)
192-QAFHELVRIVRKFLVAERPLKPSLNKTKKK- - -CVI-225	<i>Pediculus humanus corporis</i>
152-QAFHELVRIVRKFLIAERPFIEQDYKKKGKRCCK -185	<i>Drosophila melanogaster</i>
167-QAFHELVRVVRKFLSERPLIDEKGKRKGKGGKCK-CIL -203	<i>Aedes aegypti</i>
165-QAFHELVRIVRRFQEAERMNTKNYYESGKKKK -196	<i>Bombyx mori</i> (gusano de seda)

**Figura 40: Conservación de la secuencia de poli-prolina de RRas2 en distintas especies.** Los residuos de prolina conservados, están coloreados en rojo. Los residuos no conservados, en verde.

(Chavan 2015), mientras que si une GTP el HVR se separa dejando libre el Switch I para que las moléculas efectoras puedan interaccionar. Los contactos que se establecen entre ambas regiones incluyen tanto aminoácidos del Switch I como lisinas del extremo C-terminal. Además, mutaciones activadoras como G12V en KRas4B propician la separación de la región C-terminal del sitio catalítico (Lu 2015). Curiosamente, también se ha observado que mutaciones oncogénicas en KRas4B provocan un cambio en la preferencia por el fosfolípido al que se une KRas4B mediante su HVR en la membrana plasmática: en la forma silvestre KRas4B se asocia a PS (fosfatilserina), PIP<sub>2</sub> y PIP<sub>3</sub> (fosfatil-inositol (4,5) bisfosfato y (3,4,5) trifosfato, respectivamente), mientras que las mutaciones G12D y G12V hacen que se una preferentemente a PA (ácido fosfatídico) (Banerjee 2016). Por otra parte, se ha comprobado en KRas 4B asociado a membranas artificiales, que mutaciones detectadas en el síndrome de Noonan (K5N y D153V) y que no afectan al ciclo GTPasa como las mutaciones G12V o Q61L, también liberan a KRas4B del estado auto-inhibitorio provocado por el contacto con el HVR con el bolsillo de unión del nucleótido (Mazhab-Jafari 2015).

En el caso de RRas2, así como para las otras GTPasas Ras, no está claro si el HVR ejerce un efecto inhibitorio sobre la unión de efectores como lo hace con KRas4B. De hecho, en un estudio posterior en el que se utilizaron simulaciones computacionales, se concluyó que el HVR de KRas4A, más parecido al de HRas y NRas, es inestable y no se pliega como lo hace el de KRas4B (Chakrabarti 2016). Si la región de poli-prolina de RRas2 estuviera implicada en un mecanismo inhibitorio, la mutación a alanina de los residuos debería revertir la auto-inhibición y facilitar la entrada de GTP, cuando lo que en realidad ocurre es justo lo contrario. De acuerdo a los datos de intercambio de nucleótidos de los mutantes P187A y P189A, podría aventurarse que si la región de poli-prolina estuviera plegada hacia el sitio catalítico debería propiciar el intercambio de nucleótidos, lo que explicaría que al mutarlas a alanina se pierda en gran medida esta capacidad. Por otra parte, la diferencia en afinidad entre la forma GTP y GDP de RRas2 hacia el ITAM, podría indicar un tipo de conformación del HVR como se ha observado para KRas4B con el HVR hacia el bolsillo cargado con GDP. Es posible que en forma GDP, las prolina se configuren de tal manera que sean más accesibles para su asociación con las tirosinas del ITAM, y de ahí la mayor afinidad mostrada hacia RRas2 cargado con GDP.

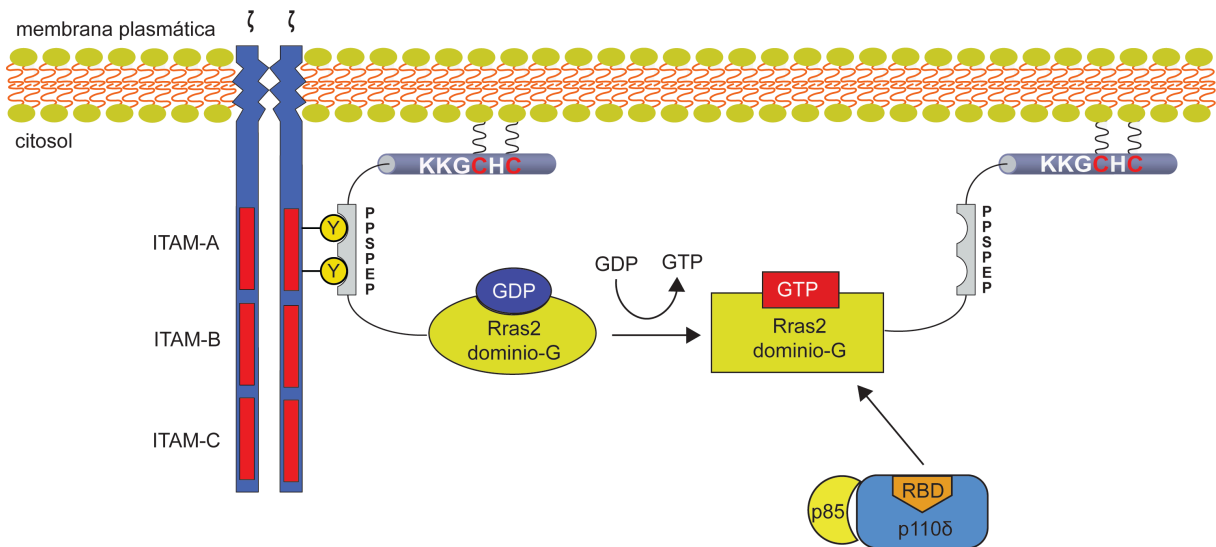
Otro aspecto de la activación de RRas2 por el TCR, es el papel que puede desempeñar el bucle  $\beta 2$ - $\beta 3$ . Como se ha visto en los Resultados, mutaciones a alanina de residuos no conservados de esta región, como D59 y R60 en RRas2, suponen una reducción notable de la actividad de RRas2. Esto sugiere que este bucle podría estar implicado en la regulación del intercambio de nucleótidos o en la hidrólisis de GTP. Aunque no se ha investigado la participación directa de estos residuos en la interacción con el ITAM  $\zeta$ a, su papel en la actividad de RRas2 podría deberse a una regulación alostérica que conectase, por una parte la unión del HVR al ITAM y por otra, el bolsillo catalítico. Por esta razón, se decidió mutar el residuo E180, para ver si estaba acoplado de manera sinérgica al bucle  $\beta 2$ - $\beta 3$ . Sin embargo, no se pudo demostrar que el residuo E180 del HVR y el bucle  $\beta 2$ - $\beta 3$  se conectaran mediante un puente salino. Esto no quiere decir que no se puedan producir interacciones de otro tipo entre el bucle  $\beta 2$ - $\beta 3$  y el HVR, ya que las mutaciones en ambos sitios resultan en pérdida de actividad. Otra razón que puede determinar la baja actividad mostrada por los mutantes D59A y R60A es que estas mutaciones provoquen una disminución en la capacidad de RRas2 de formar nanoclusters. Se ha propuesto que en las Ras clásicas, residuos del loop  $\beta 2$ - $\beta 3$  como D47 y E49 y los residuos R161 y R164 de la hélice  $\alpha 5$ , favorecen la oligomerización de Ras unido a GTP (Abankwa 2008). De hecho, en un estudio reciente se han identificado mutaciones asociadas a distintos tipos de cáncer en la región de oligomerización de Ras (Solman 2015). Estas mutaciones no alteran las propiedades bioquímicas de Ras en solución. Sin embargo, sí conducen a un aumento en el nanoclustering, lo que conlleva un mayor reclutamiento de moléculas efectoras y por tanto, mayor capacidad tumorigénica.

Por otra parte, la mutación E49K en el bucle  $\beta 2$ - $\beta 3$  ha sido encontrada en NRas en tumores de piel y hematológicos, así como en KRas, en tumores del sistema digestivo (Solman 2015). En RRas2, el residuo equivalente es otro residuo básico,



aunque en este caso es arginina, y no lisina. Esta arginina podría proporcionar a RRas2 mayor facilidad para formar nanoclusters. Existe otro residuo no conservado entre RRas2 y las Ras clásicas, cuya mutación (T50I) está asociada al síndrome de Noonan (Cirstea 2010, Cirstea 2013), que se caracteriza por una hiper-activación de la vía de Raf→Erk. Sin embargo la mayor activación que se observa en Kras mutado en T50I (Shieh 2013, Cirstea 2010, Schubbert 2007) no está asociado a una mayor formación de nanoclusters (Solman 2015). En RRas2 el equivalente a la T50, es una alanina, un aminoácido de carácter hidrofóbico más parecido a la isoleucina (I).

Por otro lado, hace tiempo se descubrió que determinados residuos del HVR



**Figura 41: Modelo de activación de RRas2 por parte del TCR, en células T:** La asociación de RRas2 a los ITAMs no fosforilados promueve el intercambio de GDP por GTP, y su activación.

de Hras lo predisponían a adoptar una orientación favorable en la membrana plasmática para la unión a sus efectores, mientras que otros tenían el efecto contrario ({Abankwa, 2008 #682}). La orientación predominante de HRas unido a GDP se estabiliza por uniones entre los aminoácidos R169 y K170 del HVR con grupos fosfato de los lípidos de la membrana plasmática, mientras que la orientación cuando está unido a GTP se establece por contactos de los residuos de la hélice  $\alpha_4$ , R128 y R135. Entre estos residuos cargados en la HVR y la hélice  $\alpha_4$  se establecen interacciones mutuamente excluyentes. Más adelante se comprobó que la mutación a alanina de estos residuos cambia la actividad de HRas-GTP, presumiblemente debido al cambio en la orientación con respecto a la membrana plasmática (Abankwa 2008, Abankwa 2010). De este modo, la mutación de los residuos que estabilizan la forma GDP, provoca un aumento de HRas G12V, y viceversa. Así, los mutantes HRas G12V-R169A y K170A ven incrementado el reclutamiento de efectores como Raf1 y PI3K, lo que se traduce en una mayor diferenciación en la línea celular PC12 (Abankwa 2010).

Aunque no se ha presentado en el apartado de resultados, se ha observado en los experimentos de far-western blot, que RRas2 recombinante aparece como dímero en



una proporción parecida e incluso superior a la del monómero. Sin embargo, sólo interacciona con el ITAM $\zeta$ a en forma monomérica. Esto podría suponer que RRas2, al igual que KRas (Muratcioglu 2015, Nan 2015, Chen 2016) forma dímeros cuando está unido a GTP, y por esta razón su unión al ITAM $\zeta$ a es menor que la forma monomérica, que estaría unida mayoritariamente a GDP.

Como se ha mostrado en el apartado de Resultados, el efecto en la generación de Akt fosforilado que se consigue tras estimular el TCR con anti-CD3, no está influenciada por la expresión de RRas2, lo que no quiere decir que RRas2 no sea necesario en la cascada de señalización generada tras la activación del TCR. Lo que es más claro, es que RRas2 tiene un papel más relevante en el mantenimiento de la señalización homeostática, tal como se describió en {Delgado, 2009 #122}. Por esto, también cabría preguntarse cuál es la proporción en linfocitos en reposo, de RRas2 y del receptor de antígeno. Si todas las moléculas de TCR en la membrana plasmática disponen de RRas2 para señalizar, o si la proporción de TCR es mayor que la de RRas2, y hubiera receptores que no pudieran interaccionar con RRas2.

Recientemente se ha descubierto, que las lisinas de la región HVR de Rras2, en concreto: K192, K194, K196 y K197, situadas entre la región de poli-prolina y la secuencia CAAX, pueden ser modificadas lipídicamente mediante acetilación (Zhang 2017). La enzima de-acetilasa encargada de revertir este proceso, es SIRT6, cuya deficiencia provoca que RRas2 sea menos capaz de activar la ruta de PI3K→Akt (Zhang 2017).

En la Figura 41, se ha esquematizado el mecanismo que proponemos para la activación por parte del receptor de antígeno de células T (TCR), de Rras2. En este modelo, el TCR estaría actuando como un GEF para RRas2, en linfocitos en reposo. Tras la activación del TCR, otros GEFs como RasGRP también contribuyen a la activación de RRas2.

## 2. RRas2 y el ITAM $\zeta$ a se asocian con una alta afinidad

Un aspecto sorprendente de la interacción entre RRas2 y el ITAM  $\zeta$ a es lo inusualmente alta que es la constante de afinidad; cuando RRas2 tiene alojado GDP, ésta es de aproximadamente 2nM. Esta afinidad es incluso superior a la de la asociación entre Zap70 y el ITAM  $\zeta$ a doblemente fosforilado (7nM) (Vely 1997). Por otro lado, Zap70 se une con mayor afinidad al ITAM $\zeta$ a, que a los otros dos ITAM de la cadena CD3 $\zeta$ ,  $\zeta$ b y  $\zeta$ c (Isakov 1995, Osman 1996, Vely 1997).

Sin datos estructurales de la interacción entre RRas2 y el ITAM $\zeta$ a, es difícil conocer la causa de tan alta afinidad. No obstante, se puede inferir por los mutantes en tirosina y leucina del ITAM, que estos dos residuos conservados podrían formar un bolsillo especialmente diseñado para el alojamiento de residuos de prolina. De hecho, se puede apreciar en el péptido C-terminal del ITAM  $\zeta$ a que las cadenas laterales de las tirosinas como y las leucinas, apuntan en el mismo sentido; lo que podría contribuir al hecho de que la mutación la tirosina C-terminal a alanina sea más crítica que la mutación

de la primera tirosin N-terminal. Por otro lado, hay que tener en cuenta que las prolinas debido a las características de su cadena lateral, están especialmente preparadas para la interacción con residuos aromáticos, como la tirosina (Zondlo 2013).

Por otra parte, los residuos básicos del ITAM  $\zeta_a$  también juegan un papel fundamental en la interacción con RRas2. En los péptidos  $\zeta_{act} mut 2$  y  $\zeta_{act} mut 4$ , la pérdida de asociación es muy notable, en especial con  $\zeta_{act} mut 4$ , lo que pone de manifiesto la importancia de las interacciones electrostáticas en la interacción. Estas interacciones electrostáticas, podrían explicar también la diferencia en afinidad encontrada entre el ITAM  $\zeta_a$  y el ITAM  $Ig\alpha$ ; en este último, así como en el ITAM de  $Ig\beta$ , la carga global es negativa, mientras que en el ITAM  $\zeta_a$  es neutra, aunque los residuos cargados están localizados en su mayoría en el extremo C-terminal. Respecto a las diferencias en afinidad entre los ITAMs de  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$ , se podría especular que sean debidas a la estructura que adopte cada uno de ellos, ya que los aminoácidos cargados están distribuidos de igual manera entre ambos.

Por otra parte, la fosforilación de las tirosinas del ITAM abole casi completamente la interacción con RRas2. Esto seguramente sea debido a que el grupo fosfato impida que la tirosina se introduzca en el surco creado por las prolinas del HVR.

La secuencia de poli-prolina de RRas2 “PPSPEP” es muy probable que se pliegue siguiendo una hélice de poli-prolina de tipo II. Este tipo de estructuras son menos abundantes que las hélices-alfa y las láminas-beta, y no suelen ser asignadas en las estructuras tridimensionales resueltas por NMR o cristalografía de rayos-x (Rucker 2002, Adzhubei 2013, Adzhubei 1994). Sin embargo, son particularmente flexibles y de conformación más extendida que la de las hélices-alfa debido a que la separación entre residuos es mayor, lo que les confiere una sección triangular. Este tipo de hélice suele encontrarse en los extremos de las proteínas, y posee ciertas características que lo convierten en un motivo de reconocimiento particularmente útil: i) por una parte, las cadenas laterales están dirigidas hacia el exterior, y ii) por otra, la conformación restringida que ya tiene de por sí esta estructura, hace que la proteína que interaccione, no tenga que adaptarse a ella, lo que es favorable desde el punto de vista energético (Zarrinpar 2003).

Las hélices de poli-prolina II, son reconocidas por dominios SH3 (Saksela 2012, Tompa 2002, Kaneko 2008) que normalmente reconocen la secuencia canónica mínima *PxxP*. Sin embargo, es muy poco probable que la interacción entre RRas2 y el ITAM sea la de un dominio SH3, principalmente por el tamaño que posee el ITAM, de unos 20 aminoácidos, mientras que los dominios SH3 suelen contener entre 50 y 100 aminoácidos. Otro aspecto en que difieren las uniones SH3 y las regiones de poli-prolina y la de RRas2 con los ITAMs es en el orden de afinidad: las uniones entre dominios SH3 y poli-prolinas suelen ser del orden micromolar (Li 2005), mientras que para RRas2 está en en torno a 1 nanomolar.

La proteína Nef del virus HIV/SIV también interacciona de manera directa con ITAMs no fosforilados (Geyer 2001). Nef es un componente muy importante para la patogenicidad de estos virus y posee numerosos sitios de unión a proteínas intracelulares, entre ellos una secuencia de poli-prolina, que le permiten regular

procesos de *down-modulación* de receptores de membrana como el TCR (Bell 1998, Schaefer 2002) , y la activación de quinasas (Bell 1998, Arold 1998, Lee 1995). Un estudio llevado a cabo con Nef codificado por SIV determinó los residuos de CD3 $\zeta$  intracelular, involucrados en la interacción (Schaefer 2000). Estos motivos, denominados SNIDs (SNID1 y SNID2), comprenden residuos tanto del primer ITAM (A) como del segundo (B), y a través de ellos, Nef ejerce procesos de modulación y reciclaje del TCR. Dentro de estos, tienen especial importancia las tirosinas y leucinas conservadas del ITAM, sin las cuales se pierde la interacción. Aunque este último trabajo no investiga los residuos de Nef involucrados en la interacción otro estudio, apunta a la secuencia de poli-prolina en HIV Nef, como responsable de dicha interacción con CD3 $\zeta$  (Xu 1999, Greenway 2003). Aunque las proteínas Nef codificadas por HIV y SIV no son idénticas en su secuencia de aminoácidos, lo que afecta también a la secuencia de poli-prolina, por lo que en SIV la interacción con CD3 $\zeta$  podría no establecerse a través de la región de poli-prolina. De hecho, esta secuencia en HIV se ha estudiado más exhaustivamente como responsable de la unión a proteínas con dominios SH3, tales como las Src-quinasas Hck y Fyn (Trible 2006, Saksela 1995). La única estructura cristalográfica hasta la fecha, de la asociación entre SIV Nef y un péptido de CD3 $\zeta$  que contiene la secuencia SNID1 (pdb: 3ik5) (Kim 2010), muestra una interacción del extremo N-terminal del primer ITAM (A), que también posee estructura helicoidal, con una hélice-alfa de Nef alejada de la secuencia de poli-prolina. Podría ser, en el caso de HIV Nef, en que se estudia la interacción con la cadena completa de CD3 $\zeta$  (Xu 1999), que la unión se produzca con otros ITAMs que no están presentes en el estudio cristalográfico, y que sí estarían interaccionando a través de la secuencia de poli-prolina. Por otra parte, un estudio biofísico ha determinado que la interacción entre Nef de SIV y CD3 $\zeta$  citoplásmico en solución se produce a una relación equimolar con una afinidad algo menor de 1 $\mu$ M (Sigalov 2008, Sigalov 2010).

### **3. RRas2 participa activamente en la ruta de PI3K→Akt, pero en menor medida en la de Raf→Erk.**

Las vías de señalización en las que participa RRas2, han sido estudiadas principalmente en líneas celulares de origen fibroblástico. Existe, de momento, poca información en otro tipo de células, como linfocitos, sobre las rutas de señalización en las que RRas2 participa. En un trabajo publicado en nuestro laboratorio, se describió el papel de RRas2 en la señalización tónica del TCR, utilizando para ello la ruta de PI3K (Delgado 2009), en concreto la isoforma P110 $\delta$ . En los resultados presentados en esta tesis, se ha puesto de manifiesto la activación preferente, frente a otras Ras clásicas como KRas, de la ruta de PI3K→Akt. Por el contrario, RRas2 es un pobre activador de la ruta de Raf→Erk, pese a que es capaz de unirse al RBD de Raf1 de manera dependiente de GTP.

Los trabajos que abordan las vías de señalización den las que participa RRas2, muestran discrepancias en cuanto a que ruta use preferentemente RRas2. En un trabajo en el que se utilizaron células 3T3 estables para RRas2 oncogénico (G23V), se observó que este inducía más Akt-fosforilado que su equivalente mutado en HRas (Rosário 2001). Así mismo, RRas2 G23V también activa la ruta de RalGDS en estas células. También se ha observado en otro trabajo, que el mutante oncogénico Q72L de RRas2 utiliza la ruta de PI3K→Akt para procesos de transformación y supervivencia en células 3T3 (Rong 2002). RRas2 necesita de PI3K y de p38MAPK para la transformación de células Eph4 (de por sí no tumorigénicas), pero no parece necesitar a Erk (Erdogan 2007).

En cambio, otros estudios apuntan a la utilización y la dependencia de Raf→Erk en los procesos de transformación y oncogénesis: se observó que RRas2 precisa de Raf1 para la transformación de células 3T3. También, que Raf1 está constitutivamente activo en células transformadas con RRas2 oncogénico (Rosário 1999). Por otra parte, se comprobó que RRas2 activo co-transfectado con Raf1 en células sf6 de insecto, interacciona con este, de forma GTP dependiente (Movilla 1999). Además, RRas2 activo (Q72L), interacciona con la secuencia canónica RBD (aa 55-130) de Raf1, pero no con la proteína completa (Graham 1996). Incluso en este mismo trabajo (Graham 1996), en un ensayo de IP de Raf1 en células 3T3 estables para RRas2 Q72L, se vio que Raf1 es capaz de fosforilar *in-vitro* a Erk, lo que indica que Raf estaba siendo activado por RRas2. En otro trabajo sobre el desarrollo de la glándula mamaria en ratón (Larive 2012), RRas2 no parece contribuir significativamente a la ruta de PI3K, ya que, en ratones deicientes (KO) para RRas2 apenas se ve modificado el grado de fosforilación de Akt, mientras que sí lo hace *in vivo*, el de Erk. Por otra parte, en otro trabajo sobre la contribución de RRas2 a la tumorigénesis primaria en cáncer de mama (Larive 2014), RRas2 activa la ruta de PI3K, incluso en células transformadas previamente con KRas, que poseen unos niveles muy altos de Erk fosforilado. Además, en MECs (células primarias epiteliales de mama), RRas2 provoca un aumento de los niveles de Akt fosforilado, pero no de Erk fosforilado.

En un estudio más sistemático sobre que efectores utiliza cada proteína Ras, (Rodríguez-Viciano 2004) demostró, que mientras que las Ras clásicas interaccionan con P110α y γ, únicamente RRas y RRas2 son capaces de interaccionar y activar *in vivo* la isoforma P110δ (junto con P110γ, la isoforma predominante en linfocitos). Por otro lado, H, K y NRas son los que más activan *in vivo*, las tres isoformas de Raf, mientras que RRas2 sólo activa ligeramente a Raf1 y en el caso de RRas no se llegó a apreciar activación.

Un factor determinante que contribuye a la activación de Raf, son las proteínas 14-3-3. Esta familia de proteínas actúa normalmente modificando la localización de la proteína a la que se unen (Muslin 2000, Mhawech 2005). Estas proteínas actúan asociándose a distintas regiones conservadas (CR) en Raf. La unión a CR2 ejerce un efecto inhibitorio para la activación de Raf, mientras que la unión al CR3 ejerce el efecto contrario. El mecanismo propuesto, postula que las proteínas 14-3-3, que existen normalmente formando dímeros entre ellas (Yaffe 1997, Petosa 1998),

estarían unidas a ambas regiones CR2, y CR3, manteniendo a Raf1 inactiva en el citosol (Tzivion 1998).

En un trabajo posterior se corroboró este mecanismo y se comprobó que además es necesario Ras-GTP para desplazar a la proteína 14-3-3 del sitio CR2, y trasladar Raf1 a la membrana plasmática (Light 2002). Adicionalmente se comprobó que tanto RRas como RRas2 activos, son incapaces de desplazar a 14-3-3 del sitio CR2, por lo que no pueden activar a Raf1 *in vivo*. Sólo son capaces de hacerlo si Raf1 está mutado en el sitio CR2, e impide la asociación de 14-3-3 (Light 2002). Esto podría constituir una explicación plausible, de porque RRas2 al contrario que otras proteínas de la familia Ras (Bos 1998) es un activador tan pobre de la ruta de MAPK a pesar de compartir con las Ras clásicas las regiones efectoras. Si existe una activación *in vivo* de Raf1 por RRas2 seguramente se deba a una sinergia con otras proteínas Ras. Por otro lado, el hecho de observar activación de la ruta de Raf→Erk por parte de RRas2 también puede ser debido a la metodología empleada en cada estudio, principalmente la utilización de la proteína completa o troncada de Raf1, y también se debe tener en cuenta que el mero hecho de transformar las células podría acarrear una activación de la vía de Raf→Erk que no sea dependiente de RRas2.

Como se comentó en el apartado de Resultados, la sobre-expresión de un mutante fosfomimético (S186E) de RRas2 no parece propiciar una mayor fosforilación de Akt, o un mayor grado de activación, en comparación a la forma silvestre o a la forma no fosforilable. Es posible que la mutación a glutámico (E) no mimetice correctamente la fosforilación, y por esto, la forma silvestre de RRas2 no se asemeja a ninguno de los dos mutantes en particular. No obstante, en un estudio proteómico realizado hace tiempo en nuestro laboratorio, se pudo observar RRas2 fosforilado en la serina 186 en células Jurkat estimulados con anti-CD3 (OKT3), sin embargo no se profundizó más en las consecuencias de esta fosforilación. Posteriormente también registró la misma fosforilación en un estudio proteómico en células IEC-6 (epitelio intestinal de rata) (Courcelles 2013). Más recientemente, se ha descubierto que la quinasa responsable de la fosforilación de S186 en RRas2 y del residuo equivalente en RRas (S201) en células 293T, es Erk1/2 (Fremin 2016). En este último trabajo, se afirma que la fosforilación en la serina, tanto en RRas como en RRas2, contribuye positivamente a la oncogenicidad de ambas proteínas, cuando se inyectan subcutáneamente células estables para ambas proteínas, en ratones. Sin embargo, se puede apreciar que en el caso del mutante S186D, el usado como fosfomimético, la mayor oncogenicidad que muestra, medida por el crecimiento del tumor transplantado, puede deberse a que las células poseen mayor cantidad de proteína que las que expresan el mutante no fosforilable (S186A), y no al efecto de la fosforilación. Este distinto grado de expresión, podría deberse a que la fosforilación haga que RRas2 sea más estable, y su expresión sea más prolongada en el tiempo.

A este respecto, según la base de datos: *Eukaryotic Linear Motif* ([www.elm.eu.org](http://www.elm.eu.org)) (Dinkel 2016), la serina 186 en RRas2 cuando se fosforila, puede ser reconocida por la cis-trans prolil-isomerasa Pin1 a través de su dominio WW de tipo IV (Macias 2002, Sudol 1995, Kato 2002). Pin1 cataliza la isomerización cis-trans del enlace

péptidico entre dos residuos de prolina, y fue identificada inicialmente interaccionando con la proteína NIMA1, una quinasa del ciclo mitótico (Yaffe 1997, Liou 2011, Shen 1998). Pin1 reconoce residuos fosforilados en serina o treonina seguidos de una prolina (pSer/Thr-Pro), y está implicada en diversos procesos celulares, especialmente aquellos relacionados con el ciclo celular. Además, Pin1 está implicada en procesos tumorigénicos (Lu 2014, Zhou 2016), especialmente en cáncer de mama (Rustighi 2017). Pin1 podría regular la estabilidad de RRas2 fosforilado en serina, mediante la adición o sustracción de moléculas de ubiquitina, como hace con algunos sustratos como la quinasa CDK10 (Khanal 2012) o c-Myc (Yeh 2004). También podría regular el estado de fosforilación de RRas2 como hace con las proteínas de la familia tau (Zhou 2000), o simplemente actuar como molécula de andamiaje, sin intervenir actividad catalítica alguna. Sin embargo, aún está por determinar si realmente es Pin1 un efector *bona fide* de RRas2.

Como se ha comprobado en este trabajo, RRas2 posee una alta tasa de intercambio intrínseco de nucleótidos *in vitro*. Lo que se traduce en que *in vivo* exista predominantemente en forma GTP. Esto es especialmente evidente si se compara con HRas, que necesita de GEFs como SOS1 para intercambiar de manera eficiente. Por el contrario, RRas2 no necesita SOS1 para intercambiar nucleótido *in vitro*, tal como se desprende del resultado expuesto en esta tesis, corroborando trabajos previamente realizados (Movilla 1999, Ohba 2000). No obstante, un estudio previo (Graham 1996) sí halló una contribución de SOS1 al intercambio de RRas2, en este caso utilizando un ensayo de luciferasa en células 3T3, en lugar de *in vitro* con nucleótidos marcados. Además, en un experimento de formación de focos, SOS1 actuaba de manera sinérgica con RRas2.

Por otro lado, el trabajo de Ohba 2000 también mostró que RRas y RRas2 utilizan preferentemente RasGRP y RasGRF, mientras que RRas3 usa GEFs propios de las Ras clásicas como SOS1.

El estado preeminentemente activo de Rras2 *in vivo*, también se refleja en los experimentos de FRET realizados en esta tesis, en los que RRas2 silvestre muestra un estado de activación casi idéntico al de su mutante oncogénico G12V; mientras que HRas silvestre muestra un estado basal de activación mucho más bajo.

## CONCLUSIONES

1. RRas2 se une *in-vitro*, de manera directa, al primer ITAM (A) de CD3 $\zeta$  con una alta afinidad. Esta es mayor cuando RRas2 está en forma GDP.
2. La interacción es máxima cuando ambas tirosinas del ITAM no están fosforiladas, y se pierde casi totalmente cuando se fosforilan.
3. RRas2 también se une a los ITAMs de las cadenas Ig $\alpha$  e Ig $\beta$ , siendo el orden de afinidad: Ig $\alpha$ > $\zeta$  $\alpha$ >Ig $\beta$ .
4. El reconocimiento de los ITAMs tiene lugar a través de la región de poliprolina de RRas2, presente en el extremo C-terminal hipervariable de RRas2.
5. La presencia del TCR en la membrana plasmática aumenta la actividad de RRas2
6. La expresión ectópica en la membrana plasmática de una quimera de la cadena de CD3 $\zeta$ , aumenta por sí sola, la actividad de RRas2 en células linfoides y no linfoides.
7. El ITAM A de CD3 $\zeta$  es capaz de activar a RRas2 silvestre *in vitro*, promoviendo la apertura del bolsillo de nucleótido.
8. El bucle  $\beta$ 2- $\beta$ 3 es necesario para mantener la alta actividad intrínseca de RRas2.

## REFERENCIAS

- Abankwa, D., A. A. Gorfe, K. Inder and J. F. Hancock (2010). Ras membrane orientation and nanodomain localization generate isoform diversity. *Proc Natl Acad Sci USA*. **107**: 1130-1135.
- Abankwa, D., M. Hanzal-Bayer, N. Ariotti, S. J. Plowman, A. A. Gorfe, R. G. Parton, J. A. McCammon and J. F. Hancock (2008). "A novel switch region regulates H-ras membrane orientation and signal output." *EMBO J* **27**(5): 727-735.
- Acuto, O. and D. Cantrell (2000). "T cell activation and the cytoskeleton." *Annu Rev Immunol* **18**: 165-184.
- Adzhubei, A. A. and M. J. Sternberg (1994). "Conservation of polyproline II helices in homologous proteins: implications for structure prediction by model building." *Protein Sci* **3**(12): 2395-2410.
- Adzhubei, A. A., M. J. E. Sternberg and A. A. Makarov (2013). Polyproline-II helix in proteins: structure and function. *J. Mol. Biol.* **425**: 2100-2132.
- Ahearn, I. M., K. Haigis, D. Bar-Sagi and M. R. Philips (2012). Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **13**: 39-51.
- Ahearn, I. M., F. D. Tsai, H. Court, M. Zhou, B. C. Jennings, M. Ahmed, N. Fehrenbacher, M. E. Linder and M. R. Philips (2011). "FKBP12 binds to acylated H-ras and promotes depalmitoylation." *Mol Cell* **41**(2): 173-185.
- Aiba, Y., M. Oh-hora, S. Kiyonaka, Y. Kimura, A. Hijikata, Y. Mori and T. Kurosaki (2004). "Activation of RasGRP3 by phosphorylation of Thr-133 is required for B cell receptor-mediated Ras activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(47): 16612-16617.
- Aktories, K., G. Schmidt and I. Just (2000). "Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins." *Biol Chem* **381**(5-6): 421-426.
- Alarcón, B., D. Gil, P. Delgado and W. W. A. Schamel (2003). Initiation of TCR signaling: regulation within CD3 dimers. *Immunol Rev.* **191**: 38-46.



- Alarcon, B. and N. Martinez-Martin (2012). "RRas2, RhoG and T-cell phagocytosis." *Small GTPases* **3**(2): 97-101.
- Alberola-Ila, J. and G. Hernández-Hoyos (2003). The Ras/MAPK cascade and the control of positive selection. *Immunol Rev.* **191**: 79-96.
- Alberola-Ila, J., K. A. Hogquist, K. A. Swan, M. J. Bevan and R. M. Perlmutter (1996). "Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways." *J Exp Med* **184**(1): 9-18.
- Alcázar, I., M. Marqués, A. Kumar, E. Hirsch, M. Wymann, A. C. Carrera and D. F. Barber (2007). Phosphoinositide 3-kinase gamma participates in T cell receptor-induced T cell activation. *J Exp Med.* **204**: 2977-2987.
- Alvarez-Moya, B., C. Lopez-Alcala, M. Drosten, O. Bachs and N. Agell (2010). "K-Ras4B phosphorylation at Ser181 is inhibited by calmodulin and modulates K-Ras activity and function." *Oncogene* **29**(44): 5911-5922.
- Andrews, S., L. R. Stephens and P. T. Hawkins (2007). "PI3K class IB pathway in neutrophils." *Sci STKE* **2007**(407): cm3.
- Antonarakis, S. E. and L. Van Aelst (1998). "Mind the GAP, Rho, Rab and GDI." *Nat Genet* **19**(2): 106-108.
- Ardouin, L., C. Boyer, A. Gillet, J. Trucy, A. M. Bernard, J. Nunes, J. Delon, A. Trautmann, H. T. He, B. Malissen and M. Malissen (1999). "Crippling of CD3-zeta ITAMs does not impair T cell receptor signaling." *Immunity* **10**(4): 409-420.
- Ariotti, N., M. A. Fernandez-Rojo, Y. Zhou, M. M. Hill, T. L. Rodkey, K. L. Inder, L. B. Tanner, M. R. Wenk, J. F. Hancock and R. G. Parton (2014). "Caveolae regulate the nanoscale organization of the plasma membrane to remotely control Ras signaling." *J Cell Biol* **204**(5): 777-792.
- Arold, S., R. O'Brien, P. Franken, M. P. Strub, F. Hoh, C. Dumas and J. E. Ladbury (1998). RT loop flexibility enhances the specificity of Src family SH3 domains for HIV-1 Nef. *Biochemistry.* **37**: 14683-14691.
- Aronheim, A. (2001). "Membrane recruitment systems for analysis of protein-protein interactions." *Methods Mol Biol* **177**: 319-328.

- Aronheim, A., D. Engelberg, N. Li, N. al-Alawi, J. Schlessinger and M. Karin (1994). "Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway." *Cell* **78**(6): 949-961.
- Arora, S., A. Matta, N. K. Shukla, S. V. Deo and R. Ralhan (2005). "Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma." *Mol Carcinog* **42**(2): 97-108.
- Ashwell, J. D. and R. D. Klausner (1990). "Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor." *Annu Rev Immunol* **8**: 139-167.
- Astorgues-Xerri, L., M. E. Riveiro, A. Tijeras-Raballand, M. Serova, C. Neuzillet, S. Albert, E. Raymond and S. Faivre (2014). "Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer." *Cancer Treat Rev* **40**(2): 307-319.
- Baker, R., S. M. Lewis, A. T. Sasaki, E. M. Wilkerson, J. W. Locasale, L. C. Cantley, B. Kuhlman, H. G. Dohlman and S. L. Campbell (2013). Site-specific monoubiquitination activates Ras by impeding GTPase-activating protein function. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**: 46-52.
- Baker, R., E. M. Wilkerson, K. Sumita, D. G. Isom, A. T. Sasaki, H. G. Dohlman and S. L. Campbell (2013). "Differences in the regulation of K-Ras and H-Ras isoforms by monoubiquitination." *J Biol Chem* **288**(52): 36856-36862.
- Banerjee, A., H. Jang, R. Nussinov and V. Gaponenko (2016). "The disordered hypervariable region and the folded catalytic domain of oncogenic K-Ras4B partner in phospholipid binding." *Curr Opin Struct Biol* **36**: 10-17.
- Banning, C., J. Votteler, D. Hoffmann, H. Koppensteiner, M. Warmer, R. Reimer, F. Kirchhoff, U. Schubert, J. Hauber and M. Schindler (2010). A flow cytometry-based FRET assay to identify and analyse protein-protein interactions in living cells. *PLoS ONE*. **5**: e9344.
- Barcelo, C., N. Paco, M. Morell, B. Alvarez-Moya, N. Bota-Rabassedas, M. Jaumot, F. Vilardell, G. Capella and N. Agell (2014). "Phosphorylation at Ser-181 of oncogenic KRAS is required for tumor growth." *Cancer Res* **74**(4): 1190-1199.
- Barker, K. T. and M. R. Crompton (1998). "Ras-related TC21 is activated by mutation in a breast cancer cell line, but infrequently in breast carcinomas in vivo." *Br J Cancer* **78**(3): 296-300.

- Barrow, A. D. and J. Trowsdale (2006). "You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling." *Eur J Immunol* **36**(7): 1646-1653.
- Belanis, L., S. J. Plowman, B. Rotblat, J. F. Hancock and Y. Kloog (2008). "Galectin-1 is a novel structural component and a major regulator of h-ras nanoclusters." *Mol Biol Cell* **19**(4): 1404-1414.
- Bell, I., C. Ashman, J. Maughan, E. Hooker, F. Cook and T. A. Reinhart (1998). Association of simian immunodeficiency virus Nef with the T-cell receptor (TCR) zeta chain leads to TCR down-modulation. *J Gen Virol.* **79 ( Pt 11)**: 2717-2727.
- Bivona, T. G., S. E. Quatela, B. O. Bodemann, I. M. Ahearn, M. J. Soskis, A. Mor, J. Miura, H. H. Wiener, L. Wright, S. G. Saba, D. Yim, A. Fein, I. Perez de Castro, C. Li, C. B. Thompson, A. D. Cox and M. R. Philips (2006). "PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis." *Mol Cell* **21**(4): 481-493.
- Blazevits, O., Y. G. Mideksa, M. Solman, A. Ligabue, N. Ariotti, H. Nakhaeizadeh, E. K. Fansa, A. C. Papageorgiou, A. Wittinghofer, M. R. Ahmadian and D. Abankwa (2016). "Galectin-1 dimers can scaffold Raf-effectors to increase H-ras nanoclustering." *Sci Rep* **6**: 24165.
- Bondeva, T., A. Balla, P. Varnai and T. Balla (2002). "Structural determinants of Ras-Raf interaction analyzed in live cells." *Mol Biol Cell* **13**(7): 2323-2333.
- Boriack-Sjodin, P. A., S. M. Margarit, D. Bar-Sagi and J. Kuriyan (1998). The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature.* **394**: 337-343.
- Bos, J. L. (1998). "All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral." *EMBO J* **17**(23): 6776-6782.
- Bos, J. L., H. Rehmann and A. Wittinghofer (2007). "GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins." *Cell* **129**(5): 865-877.
- Boykevisch, S., C. Zhao, H. Sondermann, P. Philippidou, S. Halegoua, J. Kuriyan and D. Bar-Sagi (2006). "Regulation of ras signaling dynamics by Sos-mediated positive feedback." *Curr Biol* **16**(21): 2173-2179.
- Brezski, R. J. and J. G. Monroe (2008). "B-cell receptor." *Adv Exp Med Biol* **640**: 12-21.

- Brtnva, T. R., J. K. Dragan, S. Ghosh, R. S. Terrell, S. Campbell-Burk, R. M. Bell and C. J. Der (1995). "Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras." *J Biol Chem* **270**(17): 9809-9812.
- Bunda, S., P. Heir, T. Srikumar, J. D. Cook, K. Burrell, Y. Kano, J. E. Lee, G. Zadeh, B. Raught and M. Ohh (2014). "Src promotes GTPase activity of Ras via tyrosine 32 phosphorylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(36): E3785-3794.
- Calvo, F. and P. Crespo (2009). Structural and spatial determinants regulating TC21 activation by RasGRF family nucleotide exchange factors. *Mol Biol Cell*. **20**: 4289-4302.
- Cantrell, D. A. (2002). "Transgenic analysis of thymocyte signal transduction." *Nat Rev Immunol* **2**(1): 20-27.
- Carboni, J. M., N. Yan, A. D. Cox, X. Bustelo, S. M. Graham, M. J. Lynch, R. Weinmann, B. R. Seizinger, C. J. Der, M. Barbacid and et al. (1995). "Farnesyltransferase inhibitors are inhibitors of Ras but not R-Ras2/TC21, transformation." *Oncogene* **10**(10): 1905-1913.
- Carrasco, S. and I. Mérida (2004). Diacylglycerol-dependent binding recruits PKC $\theta$  and RasGRP1 C1 domains to specific subcellular localizations in living T lymphocytes. *Mol Biol Cell*. **15**: 2932-2942.
- Castellano, E. and J. Downward (2011). RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer*. **2**: 261-274.
- Castellano, E., C. Sheridan, M. Z. Thin, E. Nye, B. Spencer-Dene, M. E. Diefenbacher, C. Moore, M. S. Kumar, M. M. Murillo, E. Grönroos, F. Lassailly, G. Stamp and J. Downward (2013). Requirement for interaction of PI3-kinase p110 $\alpha$  with RAS in lung tumor maintenance. *Cancer Cell*. **24**: 617-630.
- Chakrabarti, M., H. Jang and R. Nussinov (2016). "Comparison of the Conformations of KRAS Isoforms, K-Ras4A and K-Ras4B, Points to Similarities and Significant Differences." *J Phys Chem B* **120**(4): 667-679.
- Chan, A. M., T. Miki, K. A. Meyers and S. A. Aaronson (1994). "A human oncogene of the RAS superfamily unmasked by expression cDNA cloning." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(16): 7558-7562.
- Chandra, A., H. E. Grecco, V. Pisupati, D. Perera, L. Cassidy, F. Skoulidis, S. A. Ismail, C. Hedberg, M. Hanzal-Bayer, A. R. Venkitaraman, A. Wittinghofer and P. I. Bastiaens

- (2011). "The GDI-like solubilizing factor PDEdelta sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins." *Nat Cell Biol* **14**(2): 148-158.
- Chang, M. T., S. Asthana, S. P. Gao, B. H. Lee, J. S. Chapman, C. Kandoth, J. Gao, N. D. Socci, D. B. Solit, A. B. Olshen, N. Schultz and B. S. Taylor (2016). "Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity." *Nat Biotechnol* **34**(2): 155-163.
- Chavan, T. S., H. Jang, L. Khavrutskii, S. J. Abraham, A. Banerjee, B. C. Freed, L. Johannessen, S. G. Tarasov, V. Gaponenko, R. Nussinov and N. I. Tarasova (2015). "High-Affinity Interaction of the K-Ras4B Hypervariable Region with the Ras Active Site." *Biophys J* **109**(12): 2602-2613.
- Chen, M., A. Peters, T. Huang and X. Nan (2016). "Ras Dimer Formation as a New Signaling Mechanism and Potential Cancer Therapeutic Target." *Mini Rev Med Chem* **16**(5): 391-403.
- Cherfils, J. and M. Zeghouf (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol. Rev.* **93**: 269-309.
- Chuang, E., D. Barnard, L. Hettich, X. F. Zhang, J. Avruch and M. S. Marshall (1994). "Critical binding and regulatory interactions between Ras and Raf occur through a small, stable N-terminal domain of Raf and specific Ras effector residues." *Mol Cell Biol* **14**(8): 5318-5325.
- Cirstea, I. C., L. Gremer, R. Dvorsky, S. C. Zhang, R. P. Piekorz, M. Zenker and M. R. Ahmadian (2013). "Diverging gain-of-function mechanisms of two novel KRAS mutations associated with Noonan and cardio-facio-cutaneous syndromes." *Hum Mol Genet* **22**(2): 262-270.
- Cirstea, I. C., K. Kutsche, R. Dvorsky, L. Gremer, C. Carta, D. Horn, A. E. Roberts, F. Lepri, T. Merbitz-Zahradnik, R. Konig, C. P. Kratz, F. Pantaleoni, M. L. Dentici, V. A. Joshi, R. S. Kucherlapati, L. Mazzanti, S. Mundlos, M. A. Patton, M. C. Silengo, C. Rossi, G. Zampino, C. Digilio, L. Stuppia, E. Seemanova, L. A. Pennacchio, B. D. Gelb, B. Dallapiccola, A. Wittinghofer, M. R. Ahmadian, M. Tartaglia and M. Zenker (2010). "A restricted spectrum of NRAS mutations causes Noonan syndrome." *Nat Genet* **42**(1): 27-29.
- Clark, G. J., J. K. Dragan, R. S. Terrell, C. Bradham, C. J. Der, R. M. Bell and S. Campbell (1996). "Peptides containing a consensus Ras binding sequence from Raf-1 and the GTPase activating protein NF1 inhibit Ras function." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(4): 1577-1581.

- Clark, G. J., M. S. Kinch, T. M. Gilmer, K. Burridge and C. J. Der (1996). "Overexpression of the Ras-related TC21/R-Ras2 protein may contribute to the development of human breast cancers." *Oncogene* **12**(1): 169-176.
- Clevers, H., B. Alarcon, T. Wileman and C. Terhorst (1988). "The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble." *Annu Rev Immunol* **6**: 629-662.
- Coughlin, J. J., S. L. Stang, N. A. Dower and J. C. Stone (2005). RasGRP1 and RasGRP3 regulate B cell proliferation by facilitating B cell receptor-Ras signaling. *J Immunol.* **175**: 7179-7184.
- Courcelles, M., C. Frémin, L. Voisin, S. Lemieux, S. Meloche and P. Thibault (2013). Phosphoproteome dynamics reveal novel ERK1/2 MAP kinase substrates with broad spectrum of functions. *Mol. Syst. Biol.* **9**: 669.
- Cox, A. D., T. R. Brtva, D. G. Lowe and C. J. Der (1994). "R-Ras induces malignant, but not morphologic, transformation of NIH3T3 cells." *Oncogene* **9**(11): 3281-3288.
- Cox, A. D. and C. J. Der (2010). "Ras history: The saga continues." *Small GTPases* **1**(1): 2-27.
- Das, J., M. Ho, J. Zikherman, C. Govern, M. Yang, A. Weiss, A. K. Chakraborty and J. P. Roose (2009). "Digital signaling and hysteresis characterize ras activation in lymphoid cells." *Cell* **136**(2): 337-351.
- Daub, M., J. Jockel, T. Quack, C. K. Weber, F. Schmitz, U. R. Rapp, A. Wittinghofer and C. Block (1998). "The RafC1 cysteine-rich domain contains multiple distinct regulatory epitopes which control Ras-dependent Raf activation." *Mol Cell Biol* **18**(11): 6698-6710.
- Dekker, F. J., O. Rocks, N. Vartak, S. Menninger, C. Hedberg, R. Balamurugan, S. Wetzel, S. Renner, M. Gerauer, B. Scholermann, M. Rusch, J. W. Kramer, D. Rauh, G. W. Coates, L. Brunsveld, P. I. Bastiaens and H. Waldmann (2010). "Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling." *Nat Chem Biol* **6**(6): 449-456.
- Delgado, P., B. Cubelos, E. Calleja, N. Martínez-Martín, A. Ciprés, I. Mérida, C. Bellas, X. R. Bustelo and B. Alarcón (2009). Essential function for the GTPase TC21 in homeostatic antigen receptor signaling. *Nat Immunol.* **10**: 880-888.
- Der, C. J., T. G. Krontiris and G. M. Cooper (1982). "Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(11): 3637-3640.

- Dickson, B., F. Sprenger, D. Morrison and E. Hafen (1992). "Raf functions downstream of Ras1 in the Sevenless signal transduction pathway." *Nature* **360**(6404): 600-603.
- Dinkel, H., K. Van Roey, S. Michael, M. Kumar, B. Uyar, B. Altenberg, V. Milchevskaya, M. Schneider, H. Kuhn, A. Behrendt, S. L. Dahl, V. Damerell, S. Diebel, S. Kalman, S. Klein, A. C. Knudsen, C. Mader, S. Merrill, A. Staudt, V. Thiel, L. Welti, N. E. Davey, F. Diella and T. J. Gibson (2016). "ELM 2016--data update and new functionality of the eukaryotic linear motif resource." *Nucleic Acids Res* **44**(D1): D294-300.
- Dower, N. A., S. L. Stang, D. A. Bottorff, J. O. Ebinu, P. Dickie, H. L. Ostergaard and J. C. Stone (2000). "RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling." *Nat Immunol* **1**(4): 317-321.
- Downward, J., J. D. Graves, P. H. Warne, S. Rayter and D. A. Cantrell (1990). "Stimulation of p21ras upon T-cell activation." *Nature* **346**(6286): 719-723.
- Drivas, G. T., A. Shih, E. Coutavas, M. G. Rush and P. D'Eustachio (1990). "Characterization of four novel ras-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line." *Mol Cell Biol* **10**(4): 1793-1798.
- Drugan, J. K., R. Khosravi-Far, M. A. White, C. J. Der, Y. J. Sung, Y. W. Hwang and S. L. Campbell (1996). "Ras interaction with two distinct binding domains in Raf-1 may be required for Ras transformation." *J Biol Chem* **271**(1): 233-237.
- Ebinu, J. O., D. A. Bottorff, E. Y. Chan, S. L. Stang, R. J. Dunn and J. C. Stone (1998). "RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs." *Science* **280**(5366): 1082-1086.
- Ebinu, J. O., S. L. Stang, C. Teixeira, D. A. Bottorff, J. Hooton, P. M. Blumberg, M. Barry, R. C. Bleakley, H. L. Ostergaard and J. C. Stone (2000). RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. *Blood*. **95**: 3199-3203.
- Erdogan, M., A. Pozzi, N. Bhowmick, H. L. Moses and R. Zent (2007). Signaling pathways regulating TC21-induced tumorigenesis. *J Biol Chem*. **282**: 27713-27720.
- Erijman, A. and J. M. Shifman (2016). "RAS/Effector Interactions from Structural and Biophysical Perspective." *Mini Rev Med Chem* **16**(5): 370-375.
- Feske, S. (2007). "Calcium signalling in lymphocyte activation and disease." *Nat Rev Immunol* **7**(9): 690-702.

- Foukas, L. C., I. M. Berenjeno, A. Gray, A. Khwaja and B. Vanhaesebroeck (2010). "Activity of any class IA PI3K isoform can sustain cell proliferation and survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(25): 11381-11386.
- Franco, R., M. E. Peter, M. S. Choi, B. Malissen, J. Sancho and C. Terhorst (1994). "Characterization of the GTP/GDP binding site in the murine CD3-zeta polypeptide chain." *Immunol Lett* **43**(3): 167-175.
- Freedman, T. S., H. Sondermann, G. D. Friedland, T. Kortemme, D. Bar-Sagi, S. Marqusee and J. Kuriyan (2006). "A Ras-induced conformational switch in the Ras activator Son of sevenless." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(45): 16692-16697.
- Fremin, C., J. P. Guegan, C. Plutoni, J. Mahaffey, M. R. Philips, G. Emery and S. Meloche (2016). "ERK1/2-induced phosphorylation of R-Ras GTPases stimulates their oncogenic potential." *Oncogene*.
- Fu, G., Y. Chen, M. Yu, A. Podd, J. Schuman, Y. He, L. Di, M. Yassai, D. Haribhai, P. E. North, J. Gorski, C. B. Williams, D. Wang and R. Wen (2010). "Phospholipase C $\gamma$ 1 is essential for T cell development, activation, and tolerance." *J Exp Med* **207**(2): 309-318.
- Fung-Leung, W.-P. (2011). Phosphoinositide 3-kinase delta (PI3K $\delta$ ) in leukocyte signaling and function. *Cell Signal*. **23**: 603-608.
- Gallego, C., S. K. Gupta, L. E. Heasley, N. X. Qian and G. L. Johnson (1992). "Mitogen-activated protein kinase activation resulting from selective oncogene expression in NIH 3T3 and rat 1a cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(16): 7355-7359.
- Ganesan, A. K., T. S. Vincent, J. C. Olson and J. T. Barbieri (1999). "Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S disrupts Ras-mediated signal transduction by inhibiting guanine nucleotide exchange factor-catalyzed nucleotide exchange." *J Biol Chem* **274**(31): 21823-21829.
- Genot, E. and D. A. Cantrell (2000). "Ras regulation and function in lymphocytes." *Curr Opin Immunol* **12**(3): 289-294.
- Geyer, M., O. T. Fackler and B. M. Peterlin (2001). "Structure--function relationships in HIV-1 Nef." *EMBO Rep* **2**(7): 580-585.
- Ghosh, S. and R. M. Bell (1994). "Identification of discrete segments of human Raf-1 kinase critical for high affinity binding to Ha-Ras." *J Biol Chem* **269**(49): 30785-30788.



- Gohlke, H., C. Kiel and D. A. Case (2003). "Insights into protein-protein binding by binding free energy calculation and free energy decomposition for the Ras-Raf and Ras-RalGDS complexes." *J Mol Biol* **330**(4): 891-913.
- Goldberg, J. (1998). "Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching." *Cell* **95**(2): 237-248.
- Golec, D. P., N. A. Dower, J. C. Stone and T. A. Baldwin (2013). "RasGRP1, but not RasGRP3, is required for efficient thymic beta-selection and ERK activation downstream of CXCR4." *PLoS One* **8**(1): e53300.
- Gonzalez-Garcia, A., C. A. Pritchard, H. F. Paterson, G. Mavria, G. Stamp and C. J. Marshall (2005). "RalGDS is required for tumor formation in a model of skin carcinogenesis." *Cancer Cell* **7**(3): 219-226.
- Gotoh, T., X. Tian and L. A. Feig (2001). "Prenylation of target GTPases contributes to signaling specificity of Ras-guanine nucleotide exchange factors." *J Biol Chem* **276**(41): 38029-38035.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* **36**(1): 59-74.
- Graham, S. M., A. D. Cox, G. Drivas, M. G. Rush, P. D'Eustachio and C. J. Der (1994). "Aberrant function of the Ras-related protein TC21/R-Ras2 triggers malignant transformation." *Mol Cell Biol* **14**(6): 4108-4115.
- Graham, S. M., S. M. Oldham, C. B. Martin, J. K. Drugan, I. E. Zohn, S. Campbell and C. J. Der (1999). TC21 and Ras share indistinguishable transforming and differentiating activities. *Oncogene*. **18**: 2107-2116.
- Graham, S. M., A. B. Vojtek, S. Y. Huff, A. D. Cox, G. J. Clark, J. A. Cooper and C. J. Der (1996). "TC21 causes transformation by Raf-independent signaling pathways." *Mol Cell Biol* **16**(11): 6132-6140.
- Greenway, A. L., G. Holloway, D. A. McPhee, P. Ellis, A. Cornall and M. Lidman (2003). "HIV-1 Nef control of cell signalling molecules: multiple strategies to promote virus replication." *J Biosci* **28**(3): 323-335.
- Güldenhaupt, J., T. Rudack, P. Bachler, D. Mann, G. Triola, H. Waldmann, C. Kötting and K. Gerwert (2012). N-Ras forms dimers at POPC membranes. *Biophysical Journal*. **103**: 1585-1593.

- Guo, R., C. K. Wan, J. H. Carpenter, T. Mousallem, R. M. Boustany, C. T. Kuan, A. W. Burks and X. P. Zhong (2008). "Synergistic control of T cell development and tumor suppression by diacylglycerol kinase alpha and zeta." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(33): 11909-11914.
- Gupta, S., A. R. Ramjaun, P. Haiko, Y. Wang, P. H. Warne, B. Nicke, E. Nye, G. Stamp, K. Alitalo and J. Downward (2007). "Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice." *Cell* **129**(5): 957-968.
- Gutierrez, L., A. I. Magee, C. J. Marshall and J. F. Hancock (1989). "Post-translational processing of p21ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis." *EMBO J* **8**(4): 1093-1098.
- Gysin, S., M. Salt, A. Young and F. McCormick (2011). Therapeutic strategies for targeting ras proteins. *Genes Cancer*. **2**: 359-372.
- Hancock, J. F., A. I. Magee, J. E. Childs and C. J. Marshall (1989). "All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated." *Cell* **57**(7): 1167-1177.
- Hancock, J. F. and R. G. Parton (2005). "Ras plasma membrane signalling platforms." *Biochem J* **389**(Pt 1): 1-11.
- Hancock, J. F., H. Paterson and C. J. Marshall (1990). "A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane." *Cell* **63**(1): 133-139.
- Harding, A. and J. F. Hancock (2008). "Ras nanoclusters: combining digital and analog signaling." *Cell Cycle* **7**(2): 127-134.
- Harvey, J. J. (1964). "An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice." *Nature* **204**: 1104-1105.
- Hasan, R., S. S. Chauhan, R. Sharma and R. Ralhan (2012). "siRNA-mediated downregulation of TC21 sensitizes esophageal cancer cells to cisplatin." *World J Gastroenterol* **18**(31): 4127-4135.
- Herrmann, C. (2003). "Ras-effector interactions: after one decade." *Curr Opin Struct Biol* **13**(1): 122-129.
- Herrmann, C., M. R. Ahmadian, F. Hofmann and I. Just (1998). "Functional consequences of monoglucosylation of Ha-Ras at effector domain amino acid threonine 35." *J Biol Chem* **273**(26): 16134-16139.

- Hibino, K., T. M. Watanabe, J. Kozuka, A. H. Iwane, T. Okada, T. Kataoka, T. Yanagida and Y. Sako (2003). "Single- and multiple-molecule dynamics of the signaling from H-Ras to cRaf-1 visualized on the plasma membrane of living cells." *Chemphyschem* **4**(7): 748-753.
- Hofer, F., S. Fields, C. Schneider and G. S. Martin (1994). "Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(23): 11089-11093.
- Hu, C. D., K. Kariya, M. Tamada, K. Akasaka, M. Shirouzu, S. Yokoyama and T. Kataoka (1995). "Cysteine-rich region of Raf-1 interacts with activator domain of post-translationally modified Ha-Ras." *J Biol Chem* **270**(51): 30274-30277.
- Huang, L., J. Carney, D. M. Cardona and C. M. Counter (2014). "Decreased tumorigenesis in mice with a Kras point mutation at C118." *Nat Commun* **5**: 5410.
- Huang, Y., R. Saez, L. Chao, E. Santos, S. A. Aaronson and A. M. Chan (1995). "A novel insertional mutation in the TC21 gene activates its transforming activity in a human leiomyosarcoma cell line." *Oncogene* **11**(7): 1255-1260.
- Hwang, M. C., Y. J. Sung and Y. W. Hwang (1996). "The differential effects of the Gly-60 to Ala mutation on the interaction of H-Ras p21 with different downstream targets." *J Biol Chem* **271**(14): 8196-8202.
- Ibiza, S., A. Pérez-Rodríguez, A. Ortega, A. Martínez-Ruiz, O. Barreiro, C. A. García-Domínguez, V. M. Víctor, J. V. Esplugues, J. M. Rojas, F. Sánchez-Madrid and J. M. Serrador (2008). Endothelial nitric oxide synthase regulates N-Ras activation on the Golgi complex of antigen-stimulated T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **105**: 10507-10512.
- Iborra, S., M. Soto, L. Stark-Aroeira, E. Castellano, B. Alarcon, C. Alonso, E. Santos and E. Fernandez-Malave (2011). "H-ras and N-ras are dispensable for T-cell development and activation but critical for protective Th1 immunity." *Blood* **117**(19): 5102-5111.
- Inouye, K., S. Mizutani, H. Koide and Y. Kaziro (2000). "Formation of the Ras dimer is essential for Raf-1 activation." *J Biol Chem* **275**(6): 3737-3740.
- Ireland, C. M. (1989). "Activated N-ras oncogenes in human neuroblastoma." *Cancer Res* **49**(20): 5530-5533.

- Iritani, B. M., K. A. Forbush, M. A. Farrar and R. M. Perlmutter (1997). "Control of B cell development by Ras-mediated activation of Raf." *EMBO J* **16**(23): 7019-7031.
- Irving, B. A. and A. Weiss (1991). "The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways." *Cell* **64**(5): 891-901.
- Isakov, N., R. L. Wange, W. H. Burgess, J. D. Watts, R. Aebersold and L. E. Samelson (1995). "ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity." *J Exp Med* **181**(1): 375-380.
- Ismail, S. A., Y. X. Chen, A. Rusinova, A. Chandra, M. Bierbaum, L. Gremer, G. Triola, H. Waldmann, P. I. Bastiaens and A. Wittinghofer (2011). "Arl2-GTP and Arl3-GTP regulate a GDI-like transport system for farnesylated cargo." *Nat Chem Biol* **7**(12): 942-949.
- Itzen, A., O. Pylypenko, R. S. Goody, K. Alexandrov and A. Rak (2006). "Nucleotide exchange via local protein unfolding--structure of Rab8 in complex with MSS4." *EMBO J* **25**(7): 1445-1455.
- Iversen, L., H. L. Tu, W. C. Lin, S. M. Christensen, S. M. Abel, J. Iwig, H. J. Wu, J. Gureasko, C. Rhodes, R. S. Petit, S. D. Hansen, P. Thill, C. H. Yu, D. Stamou, A. K. Chakraborty, J. Kuriyan and J. T. Groves (2014). "Molecular kinetics. Ras activation by SOS: allosteric regulation by altered fluctuation dynamics." *Science* **345**(6192): 50-54.
- Janas, M. L. and M. Turner (2011). Interaction of Ras with p110 $\gamma$  is required for thymic  $\beta$ -selection in the mouse. *J Immunol.* **187**: 4667-4675.
- Jensen, F. C., A. J. Girardi, R. V. Gilden and H. Koprowski (1964). "Infection of Human and Simian Tissue Cultures with Rous Sarcoma Virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **52**: 53-59.
- Jeong, W. J., J. Yoon, J. C. Park, S. H. Lee, S. H. Lee, S. Kaduwal, H. Kim, J. B. Yoon and K. Y. Choi (2012). "Ras stabilization through aberrant activation of Wnt/beta-catenin signaling promotes intestinal tumorigenesis." *Sci Signal* **5**(219): ra30.
- Johnson, J. E., R. E. Goulding, Z. Ding, A. Partovi, K. V. Anthony, N. Beaulieu, G. Tazmini, R. B. Cornell and R. J. Kay (2007). "Differential membrane binding and diacylglycerol recognition by C1 domains of RasGRPs." *Biochem J* **406**(2): 223-236.

- Jun, J. E., I. Rubio and J. P. Roose (2013). Regulation of ras exchange factors and cellular localization of ras activation by lipid messengers in T cells. *Front Immunol.* **4**: 239.
- Jura, N., E. Scotto-Lavino, A. Sobczyk and D. Bar-Sagi (2006). "Differential modification of Ras proteins by ubiquitination." *Mol Cell* **21**(5): 679-687.
- Kaneko, T., L. Li and S. S. Li (2008). "The SH3 domain--a family of versatile peptide- and protein-recognition module." *Front Biosci* **13**: 4938-4952.
- Kato, Y., M. Ito, K. Kawai, K. Nagata and M. Tanokura (2002). "Determinants of ligand specificity in groups I and IV WW domains as studied by surface plasmon resonance and model building." *J Biol Chem* **277**(12): 10173-10177.
- Kawasaki, H., G. M. Springett, S. Toki, J. J. Canales, P. Harlan, J. P. Blumenstiel, E. J. Chen, I. A. Bany, N. Mochizuki, A. Ashbacher, M. Matsuda, D. E. Housman and A. M. Graybiel (1998). "A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22): 13278-13283.
- Kersh, E. N., G. J. Kersh and P. M. Allen (1999). "Partially phosphorylated T cell receptor zeta molecules can inhibit T cell activation." *J Exp Med* **190**(11): 1627-1636.
- Khanal, P., H. J. Yun, S. C. Lim, S. G. Ahn, H. E. Yoon, K. W. Kang, R. Hong and H. S. Choi (2012). "Proyl isomerase Pin1 facilitates ubiquitin-mediated degradation of cyclin-dependent kinase 10 to induce tamoxifen resistance in breast cancer cells." *Oncogene* **31**(34): 3845-3856.
- Kholodenko, B. N., J. F. Hancock and W. Kolch (2010). "Signalling ballet in space and time." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(6): 414-426.
- Khosravi-Far, R., M. A. White, J. K. Westwick, P. A. Solksi, M. Chrzanowska-Wodnicka, L. Van Aelst, M. H. Wigler and C. J. Der (1996). "Oncogenic Ras activation of Raf/mitogen-activated protein kinase-independent pathways is sufficient to cause tumorigenic transformation." *Mol Cell Biol* **16**(7): 3923-3933.
- Kikuchi, A., S. D. Demo, Z. H. Ye, Y. W. Chen and L. T. Williams (1994). "ralGDS family members interact with the effector loop of ras p21." *Mol Cell Biol* **14**(11): 7483-7491.
- Kim, R., A. Trubetskoy, T. Suzuki, N. A. Jenkins, N. G. Copeland and J. Lenz (2003). Genome-based identification of cancer genes by proviral tagging in mouse retrovirus-induced T-cell lymphomas. *J Virol.* **77**: 2056-2062.

- Kim, W. M., A. B. Sigalov and L. J. Stern (2010). Pseudo-merohedral twinning and noncrystallographic symmetry in orthorhombic crystals of SIVmac239 Nef core domain bound to different-length TCRzeta fragments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 163-175.
- Kimmelman, A., T. Tolkacheva, M. V. Lorenzi, M. Osada and A. M. Chan (1997). "Identification and characterization of R-ras3: a novel member of the RAS gene family with a non-ubiquitous pattern of tissue distribution." *Oncogene* **15**(22): 2675-2685.
- Kirsten, W. H. and L. A. Mayer (1967). "Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus." *J Natl Cancer Inst* **39**(2): 311-335.
- Klausner, R. D., J. Lippincott-Schwartz and J. S. Bonifacio (1990). "The T cell antigen receptor: insights into organelle biology." *Annu Rev Cell Biol* **6**: 403-431.
- Klinger, M. B., B. Guilbault, R. E. Goulding and R. J. Kay (2005). "Deregulated expression of RasGRP1 initiates thymic lymphomagenesis independently of T-cell receptors." *Oncogene* **24**(16): 2695-2704.
- Koide, H., T. Satoh, M. Nakafuku and Y. Kaziro (1993). "GTP-dependent association of Raf-1 with Ha-Ras: identification of Raf as a target downstream of Ras in mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18): 8683-8686.
- Kolch, W. (2000). "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions." *Biochem J* **351 Pt 2**: 289-305.
- Konstantinopoulos, P. A., M. V. Karamouzis and A. G. Papavassiliou (2007). "Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets." *Nat Rev Drug Discov* **6**(7): 541-555.
- Kortum, R. L., C. L. Sommers, C. P. Alexander, J. M. Pinski, W. Li, A. Grinberg, J. Lee, P. E. Love and L. E. Samelson (2011). "Targeted Sos1 deletion reveals its critical role in early T-cell development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(30): 12407-12412.
- Kyriakis, J. M., H. App, X. F. Zhang, P. Banerjee, D. L. Brautigan, U. R. Rapp and J. Avruch (1992). "Raf-1 activates MAP kinase-kinase." *Nature* **358**(6385): 417-421.
- Lagunoff, M., R. Majeti, A. Weiss and D. Ganem (1999). "Deregulated signal transduction by the K1 gene product of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(10): 5704-5709.

- Lander, H. M., A. J. Milbank, J. M. Tauras, D. P. Hajjar, B. L. Hempstead, G. D. Schwartz, R. T. Kraemer, U. A. Mirza, B. T. Chait, S. C. Burk and L. A. Quilliam (1996). "Redox regulation of cell signalling." *Nature* **381**(6581): 380-381.
- Lander, H. M., J. S. Ogiste, S. F. Pearce, R. Levi and A. Novogrodsky (1995). "Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras." *J Biol Chem* **270**(13): 7017-7020.
- Larive, R. M., A. Abad, C. M. Cardaba, T. Hernández, M. Cañamero, E. de Álava, E. Santos, B. Alarcón and X. R. Bustelo (2012). The Ras-like protein R-Ras2/TC21 is important for proper mammary gland development. *Mol Biol Cell*. **23**: 2373-2387.
- Larive, R. M., G. Moriggi, M. Menacho-Márquez, M. Cañamero, E. d. Álava, B. Alarcón, M. Dosil and X. R. Bustelo (2014). Contribution of the R-Ras2 GTP-binding protein to primary breast tumorigenesis and late-stage metastatic disease. *Nat Commun*. **5**: 3881.
- Laude, A. J. and I. A. Prior (2008). Palmitoylation and localisation of RAS isoforms are modulated by the hypervariable linker domain. *J Cell Sci*. **121**: 421-427.
- Lavoie, H. and M. Therrien (2015). "Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**(5): 281-298.
- Lee, C. H., B. Leung, M. A. Lemmon, J. Zheng, D. Cowburn, J. Kuriyan and K. Saksela (1995). A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein. *EMBO J*. **14**: 5006-5015.
- Lee, J. H., J. K. Pyon, S. H. Lee, Y. J. Lee, S. G. Kang, C. H. Kim, D. W. Kim, H. S. Nam, Y. H. Park, D. J. Jeong and M. K. Cho (2011). "Greater expression of TC21/R-ras2 in highly aggressive malignant skin cancer." *Int J Dermatol* **50**(8): 956-960.
- Lefranc, M. P. (1990). "Organization of the human T-cell receptor genes." *Eur Cytokine Netw* **1**(3): 121-130.
- Letourneur, F. and R. D. Klausner (1992). "Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon." *Science* **255**(5040): 79-82.
- Li, S. S. (2005). "Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction." *Biochem J* **390**(Pt 3): 641-653.

- Light, Y., H. Paterson and R. Marais (2002). "14-3-3 antagonizes Ras-mediated Raf-1 recruitment to the plasma membrane to maintain signaling fidelity." *Mol Cell Biol* **22**(14): 4984-4996.
- Lin, W.-C., L. Iversen, H.-L. Tu, C. Rhodes, S. M. Christensen, J. S. Iwig, S. D. Hansen, W. Y. C. Huang and J. T. Groves (2014). H-Ras forms dimers on membrane surfaces via a protein-protein interface. *Proc Natl Acad Sci USA*. **111**: 2996-3001.
- Liou, Y.-C., X. Z. Zhou and K. P. Lu (2011). Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins. *Trends Biochem Sci*. **36**: 501-514.
- Lowe, D. G., D. J. Capon, E. Delwart, A. Y. Sakaguchi, S. L. Naylor and D. V. Goeddel (1987). "Structure of the human and murine R-ras genes, novel genes closely related to ras proto-oncogenes." *Cell* **48**(1): 137-146.
- Lu, S., A. Banerjee, H. Jang, J. Zhang, V. Gaponenko and R. Nussinov (2015). "GTP Binding and Oncogenic Mutations May Attenuate Hypervariable Region (HVR)-Catalytic Domain Interactions in Small GTPase K-Ras4B, Exposing the Effector Binding Site." *J Biol Chem* **290**(48): 28887-28900.
- Lu, Z. and T. Hunter (2014). "Prolyl isomerase Pin1 in cancer." *Cell Res* **24**(9): 1033-1049.
- Luo, H., X. Hao, C. Ge, F. Zhao, M. Zhu, T. Chen, M. Yao, X. He and J. Li (2010). "TC21 promotes cell motility and metastasis by regulating the expression of E-cadherin and N-cadherin in hepatocellular carcinoma." *Int J Oncol* **37**(4): 853-859.
- Luo, Z., B. Diaz, M. S. Marshall and J. Avruch (1997). "An intact Raf zinc finger is required for optimal binding to processed Ras and for ras-dependent Raf activation in situ." *Mol Cell Biol* **17**(1): 46-53.
- Macha, M. A., A. Matta, U. Sriram, A. Thakkar, N. K. Shukla, S. Datta Gupta and R. Ralhan (2010). Clinical significance of TC21 overexpression in oral cancer. *J. Oral Pathol. Med.* **39**: 477-485.
- Macias, M. J., S. Wiesner and M. Sudol (2002). "WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands." *FEBS Lett* **513**(1): 30-37.
- Madrenas, J., R. L. Wange, J. L. Wang, N. Isakov, L. E. Samelson and R. N. Germain (1995). "Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists." *Science* **267**(5197): 515-518.



- Margarit, S. M., H. Sondermann, B. E. Hall, B. Nagar, A. Hoelz, M. Pirruccello, D. Bar-Sagi and J. Kuriyan (2003). "Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS." *Cell* **112**(5): 685-695.
- Martin, G. A., D. Viskochil, G. Bollag, P. C. McCabe, W. J. Crosier, H. Haubruck, L. Conroy, R. Clark, P. O'Connell, R. M. Cawthon and et al. (1990). "The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21." *Cell* **63**(4): 843-849.
- Martinez-Martin, N., E. Fernandez-Arenas, S. Cemerski, P. Delgado, M. Turner, J. Heuser, D. J. Irvine, B. Huang, X. R. Bustelo, A. Shaw and B. Alarcon (2011). "T cell receptor internalization from the immunological synapse is mediated by TC21 and RhoG GTPase-dependent phagocytosis." *Immunity* **35**(2): 208-222.
- Matsumoto, K., T. Asano and T. Endo (1997). "Novel small GTPase M-Ras participates in reorganization of actin cytoskeleton." *Oncogene* **15**(20): 2409-2417.
- Mayor, S. and H. Riezman (2004). "Sorting GPI-anchored proteins." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(2): 110-120.
- Mazhab-Jafari, M. T., C. B. Marshall, M. J. Smith, G. M. Gasmi-Seabrook, P. B. Stathopoulos, F. Inagaki, L. E. Kay, B. G. Neel and M. Ikura (2015). "Oncogenic and RASopathy-associated K-RAS mutations relieve membrane-dependent occlusion of the effector-binding site." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(21): 6625-6630.
- Mhawech, P. (2005). "14-3-3 proteins--an update." *Cell Res* **15**(4): 228-236.
- Mikkers, H., J. Allen, P. Knipscheer, L. Romeijn, A. Hart, E. Vink and A. Berns (2002). "High-throughput retroviral tagging to identify components of specific signaling pathways in cancer." *Nat Genet* **32**(1): 153-159.
- Miller, C. L., J. H. Lee, E. Kieff and R. Longnecker (1994). An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**: 772-776.
- Miller, M. J., S. Prigent, E. Kupperman, L. Rioux, S. H. Park, J. R. Feramisco, M. A. White, J. L. Rutkowski and J. L. Meinkoth (1997). "RalGDS functions in Ras- and cAMP-mediated growth stimulation." *J Biol Chem* **272**(9): 5600-5605.
- Mor, A., M. R. Philips and M. H. Pillinger (2007). The role of Ras signaling in lupus T lymphocytes: biology and pathogenesis. *Clin Immunol*. **125**: 215-223.

- Mott, H. R., J. W. Carpenter, S. Zhong, S. Ghosh, R. M. Bell and S. L. Campbell (1996). "The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: a novel ras and phospholipid binding site." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16): 8312-8317.
- Movilla, N., P. Crespo and X. R. Bustelo (1999). Signal transduction elements of TC21, an oncogenic member of the R-Ras subfamily of GTP-binding proteins. *Oncogene*. **18**: 5860-5869.
- Murakoshi, H., R. Iino, T. Kobayashi, T. Fujiwara, C. Ohshima, A. Yoshimura and A. Kusumi (2004). Single-molecule imaging analysis of Ras activation in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**: 7317-7322.
- Muratcioglu, S., T. S. Chavan, B. C. Freed, H. Jang, L. Khavrutskii, R. N. Freed, M. A. Dyba, K. Stefanisko, S. G. Tarasov, A. Gursoy, O. Keskin, N. I. Tarasova, V. Gaponenko and R. Nussinov (2015). "GTP-Dependent K-Ras Dimerization." *Structure* **23**(7): 1325-1335.
- Muslin, A. J. and H. Xing (2000). "14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference." *Cell Signal* **12**(11-12): 703-709.
- Nan, X., E. A. Collisson, S. Lewis, J. Huang, T. M. Tamguney, J. T. Liphardt, F. McCormick, J. W. Gray and S. Chu (2013). "Single-molecule superresolution imaging allows quantitative analysis of RAF multimer formation and signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(46): 18519-18524.
- Nan, X., T. M. Tamguney, E. A. Collisson, L. J. Lin, C. Pitt, J. Galeas, S. Lewis, J. W. Gray, F. McCormick and S. Chu (2015). "Ras-GTP dimers activate the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(26): 7996-8001.
- Neel, N. F., T. D. Martin, J. K. Stratford, T. P. Zand, D. J. Reiner and C. J. Der (2011). "The RalGEF-Ral Effector Signaling Network: The Road Less Traveled for Anti-Ras Drug Discovery." *Genes Cancer* **2**(3): 275-287.
- Oeste, C. L., B. Díez-Dacal, F. Bray, M. García de Lacoba, B. G. de la Torre, D. Andreu, A. J. Ruiz-Sánchez, E. Pérez-Inestrosa, C. A. García-Domínguez, J. M. Rojas and D. Pérez-Sala (2011). The C-terminus of H-Ras as a target for the covalent binding of reactive compounds modulating Ras-dependent pathways. *PLoS ONE*. **6**: e15866.
- Ohba, Y., N. Mochizuki, S. Yamashita, A. M. Chan, J. W. Schrader, S. Hattori, K. Nagashima and M. Matsuda (2000). Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J Biol Chem*. **275**: 20020-20026.

- Okazaki, M., S. Kishida, T. Hinoi, T. Hasegawa, M. Tamada, T. Kataoka and A. Kikuchi (1997). "Synergistic activation of c-fos promoter activity by Raf and Ral GDP dissociation stimulator." *Oncogene* **14**(5): 515-521.
- Okkenhaug, K. (2013). Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells. *Annu Rev Immunol.* **31**: 675-704.
- Okkenhaug, K., K. Ali and B. Vanhaesebroeck (2007). "Antigen receptor signalling: a distinctive role for the p110delta isoform of PI3K." *Trends Immunol* **28**(2): 80-87.
- Okkenhaug, K., A. Bilancio, G. Farjot, H. Priddle, S. Sancho, E. Peskett, W. Pearce, S. E. Meek, A. Salpekar, M. D. Waterfield, A. J. Smith and B. Vanhaesebroeck (2002). "Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice." *Science* **297**(5583): 1031-1034.
- Osman, N., H. Turner, S. Lucas, K. Reif and D. A. Cantrell (1996). "The protein interactions of the immunoglobulin receptor family tyrosine-based activation motifs present in the T cell receptor zeta subunits and the CD3 gamma, delta and epsilon chains." *Eur J Immunol* **26**(5): 1063-1068.
- Palomero, T., K. C. Barnes, P. J. Real, J. L. Glade Bender, M. L. Sulis, V. V. Murty, A. I. Colovai, M. Balbin and A. A. Ferrando (2006). "CUTLL1, a novel human T-cell lymphoma cell line with t(7;9) rearrangement, aberrant NOTCH1 activation and high sensitivity to gamma-secretase inhibitors." *Leukemia* **20**(7): 1279-1287.
- Parada, L. F., C. J. Tabin, C. Shih and R. A. Weinberg (1982). "Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene." *Nature* **297**(5866): 474-478.
- Paz, A., R. Haklai, G. Elad-Sfadia, E. Ballan and Y. Kloog (2001). "Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation." *Oncogene* **20**(51): 7486-7493.
- Perez de Castro, I., T. G. Bivona, M. R. Philips and A. Pellicer (2004). Ras activation in Jurkat T cells following low-grade stimulation of the T-cell receptor is specific to N-Ras and occurs only on the Golgi apparatus. *Mol Cell Biol.* **24**: 3485-3496.
- Perez de Castro, I., R. Diaz, M. Malumbres, M. I. Hernandez, J. Jagirdar, M. Jimenez, D. Ahn and A. Pellicer (2003). "Mice deficient for N-ras: impaired antiviral immune response and T-cell function." *Cancer Res* **63**(7): 1615-1622.

- Peter, M. E., C. Hall, A. Ruhlmann, J. Sancho and C. Terhorst (1992). "The T-cell receptor zeta chain contains a GTP/GDP binding site." *EMBO J* **11**(3): 933-941.
- Peter, M. E., T. Wileman and C. Terhorst (1993). "Covalent binding of guanine nucleotides to the CD3-gamma chain of the T cell receptor/CD3 complex." *Eur J Immunol* **23**(2): 461-466.
- Petosa, C., S. C. Masters, L. A. Bankston, J. Pohl, B. Wang, H. Fu and R. C. Liddington (1998). "14-3-3zeta binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove." *J Biol Chem* **273**(26): 16305-16310.
- Pinheiro da Silva, F., M. Aloulou, M. Benhamou and R. C. Monteiro (2008). "Inhibitory ITAMs: a matter of life and death." *Trends Immunol* **29**(8): 366-373.
- Pitcher, L. A., P. S. Ohashi and N. S. van Oers (2003). "T cell antagonism is functionally uncoupled from the 21- and 23-kDa tyrosine-phosphorylated TCR zeta subunits." *J Immunol* **171**(2): 845-852.
- Pitcher, L. A. and N. S. C. van Oers (2003). T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends Immunol.* **24**: 554-560.
- Pitcher, L. A., J. A. Young, M. A. Mathis, P. C. Wrage, B. Bartók and N. S. C. van Oers (2003). The formation and functions of the 21- and 23-kDa tyrosine-phosphorylated TCR zeta subunits. *Immunol Rev.* **191**: 47-61.
- Plowman, S. J., C. Muncke, R. G. Parton and J. F. Hancock (2005). "H-ras, K-ras, and inner plasma membrane raft proteins operate in nanoclusters with differential dependence on the actin cytoskeleton." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(43): 15500-15505.
- Priatel, J. J., S. J. Teh, N. A. Dower, J. C. Stone and H. S. Teh (2002). "RasGRP1 transduces low-grade TCR signals which are critical for T cell development, homeostasis, and differentiation." *Immunity* **17**(5): 617-627.
- Prior, I. A., A. Harding, J. Yan, J. Sluimer, R. G. Parton and J. F. Hancock (2001). "GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity." *Nat Cell Biol* **3**(4): 368-375.
- Prior, I. A., P. D. Lewis and C. Mattos (2012). A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* **72**: 2457-2467.

- Prior, I. A., C. Muncke, R. G. Parton and J. F. Hancock (2003). Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J. Cell Biol.* **160**: 165-170.
- Pulvertaft, J. V. (1964). "Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma)." *Lancet* **1**(7327): 238-240.
- Ramadani, F., D. J. Bolland, F. Garcon, J. L. Emery, B. Vanhaesebroeck, A. E. Corcoran and K. Okkenhaug (2010). The PI3K Isoforms p110{alpha} and p110{delta} Are Essential for Pre-B Cell Receptor Signaling and B Cell Development. *Sci Signal*, AAAS. **3**: ra60.
- Rambaratsingh, R. A., J. C. Stone, P. M. Blumberg and P. S. Lorenzo (2003). "RasGRP1 represents a novel non-protein kinase C phorbol ester signaling pathway in mouse epidermal keratinocytes." *J Biol Chem* **278**(52): 52792-52801.
- Reid, T. S., K. L. Terry, P. J. Casey and L. S. Beese (2004). Crystallographic analysis of CaaX prenyltransferases complexed with substrates defines rules of protein substrate selectivity. *J. Mol. Biol.* **343**: 417-433.
- Reif, K., K. Okkenhaug, T. Sasaki, J. M. Penninger, B. Vanhaesebroeck and J. G. Cyster (2004). "Cutting edge: differential roles for phosphoinositide 3-kinases, p110gamma and p110delta, in lymphocyte chemotaxis and homing." *J Immunol* **173**(4): 2236-2240.
- Renault, L., J. Kuhlmann, A. Henkel and A. Wittinghofer (2001). "Structural basis for guanine nucleotide exchange on Ran by the regulator of chromosome condensation (RCC1)." *Cell* **105**(2): 245-255.
- Repasky, G. A., E. J. Chenette and C. J. Der (2004). "Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis?" *Trends Cell Biol* **14**(11): 639-647.
- Reth, M. (1989). "Antigen receptor tail clue." *Nature* **338**(6214): 383-384.
- Reth, M. (1992). "Antigen receptors on B lymphocytes." *Annu Rev Immunol* **10**: 97-121.
- Reuther, G. W., Q. T. Lambert, J. F. Rebhun, M. A. Caligiuri, L. A. Quilliam and C. J. Der (2002). "RasGRP4 is a novel Ras activator isolated from acute myeloid leukemia." *J Biol Chem* **277**(34): 30508-30514.

- Rittinger, K., P. A. Walker, J. F. Eccleston, S. J. Smerdon and S. J. Gamblin (1997). "Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue." *Nature* **389**(6652): 758-762.
- Rodriguez-Viciana, P., C. Sabatier and F. McCormick (2004). Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol Cell Biol.* **24**: 4943-4954.
- Rodriguez-Viciana, P., P. H. Warne, R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, M. J. Fry, M. D. Waterfield and J. Downward (1994). "Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras." *Nature* **370**(6490): 527-532.
- Rojas, A. M., G. Fuentes, A. Rausell and A. Valencia (2012). The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J. Cell Biol.* **196**: 189-201.
- Rokavec, M., W. Schroth, S. M. Amaral, P. Fritz, L. Antoniadou, D. Glavac, W. Simon, M. Schwab, M. Eichelbaum and H. Brauch (2008). "A polymorphism in the TC21 promoter associates with an unfavorable tamoxifen treatment outcome in breast cancer." *Cancer Res* **68**(23): 9799-9808.
- Romeo, C., M. Amiot and B. Seed (1992). "Sequence requirements for induction of cytolysis by the T cell antigen/Fc receptor zeta chain." *Cell* **68**(5): 889-897.
- Romeo, C. and B. Seed (1991). "Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides." *Cell* **64**(5): 1037-1046.
- Rong, R., Q. He, Y. Liu, M. S. Sheikh and Y. Huang (2002). "TC21 mediates transformation and cell survival via activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathway." *Oncogene* **21**(7): 1062-1070.
- Roose, J. P., M. Mollenauer, V. A. Gupta, J. Stone and A. Weiss (2005). A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Mol Cell Biol.* **25**: 4426-4441.
- Roose, J. P., M. Mollenauer, M. Ho, T. Kurosaki and A. Weiss (2007). "Unusual interplay of two types of Ras activators, RasGRP and SOS, establishes sensitive and robust Ras activation in lymphocytes." *Mol Cell Biol* **27**(7): 2732-2745.
- Rosário, M., H. F. Paterson and C. J. Marshall (1999). Activation of the Raf/MAP kinase cascade by the Ras-related protein TC21 is required for the TC21-mediated transformation of NIH 3T3 cells. *EMBO J.* **18**: 1270-1279.

- Rosário, M., H. F. Paterson and C. J. Marshall (2001). Activation of the Ral and phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathways by the ras-related protein TC21. *Mol Cell Biol* **21**: 3750-3762.
- Roskoski, R., Jr. (2010). "RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation." *Biochem Biophys Res Commun* **399**(3): 313-317.
- Roskoski, R., Jr. and P. Ritchie (1998). "Role of the carboxyterminal residue in peptide binding to protein farnesyltransferase and protein geranylgeranyltransferase." *Arch Biochem Biophys* **356**(2): 167-176.
- Rotblat, B., L. Belanis, H. Liang, R. Haklai, G. Elad-Zefadia, J. F. Hancock, Y. Kloog and S. J. Plowman (2010). H-Ras nanocluster stability regulates the magnitude of MAPK signal output. *PLoS ONE*. **5**: e11991.
- Roy, S., R. Luetterforst, A. Harding, A. Apolloni, M. Etheridge, E. Stang, B. Rolls, J. F. Hancock and R. G. Parton (1999). "Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains." *Nat Cell Biol* **1**(2): 98-105.
- Roy, S., S. Plowman, B. Rotblat, I. A. Prior, C. Muncke, S. Grainger, R. G. Parton, Y. I. Henis, Y. Kloog and J. F. Hancock (2005). "Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization, and signaling." *Mol Cell Biol* **25**(15): 6722-6733.
- Rucker, A. L. and T. P. Creamer (2002). "Polyproline II helical structure in protein unfolded states: lysine peptides revisited." *Protein Sci* **11**(4): 980-985.
- Ruiz, S., E. Santos and X. R. Bustelo (2007). "RasGRF2, a guanosine nucleotide exchange factor for Ras GTPases, participates in T-cell signaling responses." *Mol Cell Biol* **27**(23): 8127-8142.
- Rustighi, A., A. Zannini, E. Campaner, Y. Ciani, S. Piazza and G. Del Sal (2017). "PIN1 in breast development and cancer: a clinical perspective." *Cell Death Differ* **24**(2): 200-211.
- Saez, R., A. M. Chan, T. Miki and S. A. Aaronson (1994). "Oncogenic activation of human R-ras by point mutations analogous to those of prototype H-ras oncogenes." *Oncogene* **9**(10): 2977-2982.

- Saksela, K., G. Cheng and D. Baltimore (1995). Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4. *EMBO J.* **14**: 484-491.
- Saksela, K. and P. Permi (2012). SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity? *FEBS Lett.* **586**: 2609-2614.
- Samuels, Y. and T. Waldman (2010). "Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers." *Curr Top Microbiol Immunol* **347**: 21-41.
- Sancho, J., M. E. Peter, R. Franco, S. Danielian, J. S. Kang, R. Fagard, J. Woods, J. C. Reed, M. Kamoun and C. Terhorst (1993). "Coupling of GTP-binding to the T cell receptor (TCR) zeta-chain with TCR-mediated signal transduction." *J Immunol* **150**(8 Pt 1): 3230-3242.
- Santos, E. (2014). Dimerization opens new avenues into Ras signaling research. *Sci Signal.* **7**: pe12.
- Santos, E., A. R. Nebreda, T. Bryan and E. S. Kempner (1988). "Oligomeric structure of p21 ras proteins as determined by radiation inactivation." *J Biol Chem* **263**(20): 9853-9858.
- Santos, E., S. R. Tronick, S. A. Aaronson, S. Pulciani and M. Barbacid (1982). "T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes." *Nature* **298**(5872): 343-347.
- Sasaki, A. T., A. Carracedo, J. W. Locasale, D. Anastasiou, K. Takeuchi, E. R. Kahoud, S. Haviv, J. M. Asara, P. P. Pandolfi and L. C. Cantley (2011). Ubiquitination of K-Ras enhances activation and facilitates binding to select downstream effectors. *Sci Signal.* **4**: ra13.
- Saudemont, A., F. Garcon, H. Yadi, M. Roche-Molina, N. Kim, A. Segonds-Pichon, A. Martin-Fontecha, K. Okkenhaug and F. Colucci (2009). "p110gamma and p110delta isoforms of phosphoinositide 3-kinase differentially regulate natural killer cell migration in health and disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(14): 5795-5800.
- Schaefer, T. M., I. Bell, B. A. Fallert and T. A. Reinhart (2000). The T-cell receptor zeta chain contains two homologous domains with which simian immunodeficiency virus Nef interacts and mediates down-modulation. *J Virol.* **74**: 3273-3283.
- Schaefer, T. M., I. Bell, M. E. Pfeifer, M. Ghosh, R. P. Tribble, C. L. Fuller, C. Ashman and T. A. Reinhart (2002). The conserved process of TCR/CD3 complex down-modulation



- by SIV Nef is mediated by the central core, not endocytic motifs. *Virology*. **302**: 106-122.
- Schamel, W. W. and M. Reth (2000). "Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor." *Immunity* **13**(1): 5-14.
- Scheffzek, K., M. R. Ahmadian, W. Kabsch, L. Wiesmuller, A. Lautwein, F. Schmitz and A. Wittinghofer (1997). "The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants." *Science* **277**(5324): 333-338.
- Schmick, M., N. Vartak, B. Papke, M. Kovacevic, D. C. Truxius, L. Rossmannek and P. I. Bastiaens (2014). "KRas localizes to the plasma membrane by spatial cycles of solubilization, trapping and vesicular transport." *Cell* **157**(2): 459-471.
- Schneider, U., H. U. Schwenk and G. Bornkamm (1977). "Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma." *Int J Cancer* **19**(5): 621-626.
- Schubbert, S., K. Shannon and G. Bollag (2007). "Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer." *Nat Rev Cancer* **7**(4): 295-308.
- Sengupta, P., T. Jovanovic-Talisman, D. Skoko, M. Renz, S. L. Veatch and J. Lippincott-Schwartz (2011). "Probing protein heterogeneity in the plasma membrane using PALM and pair correlation analysis." *Nat Methods* **8**(11): 969-975.
- Shahinian, S. and J. R. Silvius (1995). "Doubly-lipid-modified protein sequence motifs exhibit long-lived anchorage to lipid bilayer membranes." *Biochemistry* **34**(11): 3813-3822.
- Shalom-Feuerstein, R., S. J. Plowman, B. Rotblat, N. Ariotti, T. Tian, J. F. Hancock and Y. Kloog (2008). "K-ras nanoclustering is subverted by overexpression of the scaffold protein galectin-3." *Cancer Res* **68**(16): 6608-6616.
- Sharma, P., R. Varma, R. C. Sarasij, Ira, K. Gousset, G. Krishnamoorthy, M. Rao and S. Mayor (2004). "Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes." *Cell* **116**(4): 577-589.
- Sharma, R., N. Sud, T. K. Chattopadhyay and R. Ralhan (2005). "TC21/R-Ras2 upregulation in esophageal tumorigenesis: potential diagnostic implications." *Oncology* **69**(1): 10-18.

- Shen, M., P. T. Stukenberg, M. W. Kirschner and K. P. Lu (1998). "The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins." *Genes Dev* **12**(5): 706-720.
- Shieh, A., A. F. Ward, K. L. Donlan, E. R. Harding-Theobald, J. Xu, C. G. Mullighan, C. Zhang, S. C. Chen, X. Su, J. R. Downing, G. E. Bollag and K. M. Shannon (2013). "Defective K-Ras oncoproteins overcome impaired effector activation to initiate leukemia in vivo." *Blood* **121**(24): 4884-4893.
- Sigalov, A. B. (2010). Unusual biophysics of immune signaling-related intrinsically disordered proteins. *Self Nonself*. **1**: 271-281.
- Sigalov, A. B., W. M. Kim, M. Saline and L. J. Stern (2008). The intrinsically disordered cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain binds to the nef protein of simian immunodeficiency virus without a disorder-to-order transition. *Biochemistry*. **47**: 12942-12944.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." *Nature* **387**(6633): 569-572.
- Simons, K. and J. L. Sampaio (2011). "Membrane organization and lipid rafts." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(10): a004697.
- Sloan-Lancaster, J., A. S. Shaw, J. B. Rothbard and P. M. Allen (1994). "Partial T cell signaling: altered phospho-zeta and lack of zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy." *Cell* **79**(5): 913-922.
- Solman, M., A. Ligabue, O. Blazevits, A. Jaiswal, Y. Zhou, H. Liang, B. Lectez, K. Kopra, C. Guzman, H. Harma, J. F. Hancock, T. Aittokallio and D. Abankwa (2015). "Specific cancer-associated mutations in the switch III region of Ras increase tumorigenicity by nanocluster augmentation." *Elife* **4**: e08905.
- Sondermann, H., S. M. Soisson, S. Boykevisch, S. S. Yang, D. Bar-Sagi and J. Kuriyan (2004). "Structural analysis of autoinhibition in the Ras activator Son of sevenless." *Cell* **119**(3): 393-405.
- Stone, J. C. (2011). Regulation and Function of the RasGRP Family of Ras Activators in Blood Cells. *Genes Cancer*. **2**: 320-334.
- Sudol, M., H. I. Chen, C. Bougeret, A. Einbond and P. Bork (1995). "Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain." *FEBS Lett* **369**(1): 67-71.

- Sung, P. J., F. D. Tsai, H. Vais, H. Court, J. Yang, N. Fehrenbacher, J. K. Foskett and M. R. Philips (2013). "Phosphorylated K-Ras limits cell survival by blocking Bcl-xL sensitization of inositol trisphosphate receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(51): 20593-20598.
- Suzuki, T., H. Shen, K. Akagi, H. C. Morse, J. D. Malley, D. Q. Naiman, N. A. Jenkins and N. G. Copeland (2002). "New genes involved in cancer identified by retroviral tagging." *Nat Genet* **32**(1): 166-174.
- Swan, K. A., J. Alberola-Ila, J. A. Gross, M. W. Appleby, K. A. Forbush, J. F. Thomas and R. M. Perlmutter (1995). "Involvement of p21ras distinguishes positive and negative selection in thymocytes." *EMBO J* **14**(2): 276-285.
- Swarthout, J. T., S. Lobo, L. Farh, M. R. Croke, W. K. Greentree, R. J. Deschenes and M. E. Linder (2005). "DHH9 and GCP16 constitute a human protein fatty acyltransferase with specificity for H- and N-Ras." *J Biol Chem* **280**(35): 31141-31148.
- Swat, W., Y. Shinkai, H. L. Cheng, L. Davidson and F. W. Alt (1996). "Activated Ras signals differentiation and expansion of CD4+8+ thymocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(10): 4683-4687.
- Tamada, M., C. D. Hu, K. Kariya, T. Okada and T. Kataoka (1997). "Membrane recruitment of Raf-1 is not the only function of Ras in Raf-1 activation." *Oncogene* **15**(24): 2959-2964.
- Thapar, R., J. G. Williams and S. L. Campbell (2004). NMR characterization of full-length farnesylated and non-farnesylated H-Ras and its implications for Raf activation. *J. Mol. Biol.* **343**: 1391-1408.
- Tian, T., A. Harding, K. Inder, S. Plowman, R. G. Parton and J. F. Hancock (2007). "Plasma membrane nanoswitches generate high-fidelity Ras signal transduction." *Nat Cell Biol* **9**(8): 905-914.
- Ting, P. Y., C. W. Johnson, C. Fang, X. Cao, T. G. Graeber, C. Mattos and J. Colicelli (2015). "Tyrosine phosphorylation of RAS by ABL allosterically enhances effector binding." *FASEB J* **29**(9): 3750-3761.
- Tomba, P. (2002). "Intrinsically unstructured proteins." *Trends Biochem Sci* **27**(10): 527-533.

- Trahey, M. and F. McCormick (1987). "A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants." *Science* **238**(4826): 542-545.
- Tribble, R. P., L. Emert-Sedlak and T. E. Smithgall (2006). HIV-1 Nef selectively activates Src family kinases Hck, Lyn, and c-Src through direct SH3 domain interaction. *J Biol Chem.* **281**: 27029-27038.
- Tsai, F. D., M. S. Lopes, M. Zhou, H. Court, O. Ponce, J. J. Fiordalisi, J. J. Gierut, A. D. Cox, K. M. Haigis and M. R. Philips (2015). "K-Ras4A splice variant is widely expressed in cancer and uses a hybrid membrane-targeting motif." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(3): 779-784.
- Tzivion, G., Z. Luo and J. Avruch (1998). "A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity." *Nature* **394**(6688): 88-92.
- Underhill, D. M. and H. S. Goodridge (2007). The many faces of ITAMs. *Trends Immunol.* **28**: 66-73.
- van Oers, N. S., N. Killeen and A. Weiss (1994). "ZAP-70 is constitutively associated with tyrosine-phosphorylated TCR zeta in murine thymocytes and lymph node T cells." *Immunity* **1**(8): 675-685.
- van Zanten, T. S., A. Cambi and M. F. Garcia-Parajo (2010). "A nanometer scale optical view on the compartmentalization of cell membranes." *Biochim Biophys Acta* **1798**(4): 777-787.
- Vanhaesebroeck, B., J. Guillermet-Guibert, M. Graupera and B. Bilanges (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **11**: 329-341.
- Vely, F., J. A. Nunes, B. Malissen and C. J. Hedgecock (1997). "Analysis of immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) binding to ZAP-70 by surface plasmon resonance." *Eur J Immunol* **27**(11): 3010-3014.
- Vetter, I. R. and A. Wittinghofer (2001). "The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions." *Science* **294**(5545): 1299-1304.
- Vigil, D., J. Cherfils, K. L. Rossman and C. J. Der (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat. Rev. Cancer.* **10**: 842-857.

- Villalonga, P., C. Lopez-Alcala, M. Bosch, A. Chiloeches, N. Rocamora, J. Gil, R. Marais, C. J. Marshall, O. Bachs and N. Agell (2001). "Calmodulin binds to K-Ras, but not to H- or N-Ras, and modulates its downstream signaling." *Mol Cell Biol* **21**(21): 7345-7354.
- Villalonga, P., C. Lopez-Alcala, A. Chiloeches, J. Gil, R. Marais, O. Bachs and N. Agell (2002). "Calmodulin prevents activation of Ras by PKC in 3T3 fibroblasts." *J Biol Chem* **277**(40): 37929-37935.
- Vo, U., N. Vajpai, L. Flavell, R. Bobby, A. L. Breeze, K. J. Embrey and A. P. Golovanov (2016). "Monitoring Ras Interactions with the Nucleotide Exchange Factor Son of Sevenless (Sos) Using Site-specific NMR Reporter Signals and Intrinsic Fluorescence." *J Biol Chem* **291**(4): 1703-1718.
- Vojtek, A. B., S. M. Hollenberg and J. A. Cooper (1993). "Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf." *Cell* **74**(1): 205-214.
- Warnecke, N., M. Poltorak, B. S. Kowtharapu, B. Arndt, J. C. Stone, B. Schraven and L. Simeoni (2012). "TCR-mediated Erk activation does not depend on Sos and Grb2 in peripheral human T cells." *EMBO Rep* **13**(4): 386-391.
- Waters, S. B., K. Yamauchi and J. E. Pessin (1995). "Insulin-stimulated disassociation of the SOS-Grb2 complex." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2791-2799.
- Wennerberg, K., K. L. Rossman and C. J. Der (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci.* **118**: 843-846.
- White, M. A., C. Nicolette, A. Minden, A. Polverino, L. Van Aelst, M. Karin and M. H. Wigler (1995). "Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation." *Cell* **80**(4): 533-541.
- Whyte, D. B., P. Kirschmeier, T. N. Hockenberry, I. Nunez-Oliva, L. James, J. J. Catino, W. R. Bishop and J. K. Pai (1997). "K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors." *J Biol Chem* **272**(22): 14459-14464.
- Willems, L., J. S. Gatot, M. Mammerickx, D. Portetelle, A. Burny, P. Kerkhofs and R. Kettmann (1995). "The YXXL signalling motifs of the bovine leukemia virus transmembrane protein are required for in vivo infection and maintenance of high viral loads." *J Virol* **69**(7): 4137-4141.
- Williams, A. F. and A. N. Barclay (1988). "The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition." *Annu Rev Immunol* **6**: 381-405.

- Williams, J. G., J. K. Drugan, G. S. Yi, G. J. Clark, C. J. Der and S. L. Campbell (2000). "Elucidation of binding determinants and functional consequences of Ras/Raf-cysteine-rich domain interactions." *J Biol Chem* **275**(29): 22172-22179.
- Williams, J. G., K. Pappu and S. L. Campbell (2003). "Structural and biochemical studies of p21Ras S-nitrosylation and nitric oxide-mediated guanine nucleotide exchange." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(11): 6376-6381.
- Winkler, D. G., R. E. Cutler, Jr., J. K. Drugan, S. Campbell, D. K. Morrison and J. A. Cooper (1998). "Identification of residues in the cysteine-rich domain of Raf-1 that control Ras binding and Raf-1 activity." *J Biol Chem* **273**(34): 21578-21584.
- Witherden, D., N. van Oers, C. Waltzinger, A. Weiss, C. Benoist and D. Mathis (2000). "Tetracycline-controllable selection of CD4(+) T cells: half-life and survival signals in the absence of major histocompatibility complex class II molecules." *J Exp Med* **191**(2): 355-364.
- Wittinghofer, A. and I. R. Vetter (2011). "Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif." *Annu Rev Biochem* **80**: 943-971.
- Wolthuis, R. M. and J. L. Bos (1999). "Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral." *Curr Opin Genet Dev* **9**(1): 112-117.
- Wong, K. A., A. Russo, X. Wang, Y. J. Chen, A. Lavie and J. P. O'Bryan (2012). "A new dimension to Ras function: a novel role for nucleotide-free Ras in Class II phosphatidylinositol 3-kinase beta (PI3KC2beta) regulation." *PLoS One* **7**(9): e45360.
- Xu, X. N., B. Laffert, G. R. Screaton, M. Kraft, D. Wolf, W. Kolanus, J. Mongkolsapay, A. J. McMichael and A. S. Baur (1999). "Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain." *J Exp Med* **189**(9): 1489-1496.
- Yaffe, M. B., K. Rittinger, S. Volinia, P. R. Caron, A. Aitken, H. Leffers, S. J. Gamblin, S. J. Smerdon and L. C. Cantley (1997). "The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity." *Cell* **91**(7): 961-971.
- Yaffe, M. B., M. Schutkowski, M. Shen, X. Z. Zhou, P. T. Stukenberg, J. U. Rahfeld, J. Xu, J. Kuang, M. W. Kirschner, G. Fischer, L. C. Cantley and K. P. Lu (1997). "Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism." *Science* **278**(5345): 1957-1960.

- Yamashita, M., R. Shinnakasu, H. Asou, M. Kimura, A. Hasegawa, K. Hashimoto, N. Hatano, M. Ogata and T. Nakayama (2005). "Ras-ERK MAPK cascade regulates GATA3 stability and Th2 differentiation through ubiquitin-proteasome pathway." *J Biol Chem* **280**(33): 29409-29419.
- Yang, D., N. Kedei, L. Li, J. Tao, J. F. Velasquez, A. M. Michalowski, B. I. Toth, R. Marincsak, A. Varga, T. Biro, S. H. Yuspa and P. M. Blumberg (2010). "RasGRP3 contributes to formation and maintenance of the prostate cancer phenotype." *Cancer Res* **70**(20): 7905-7917.
- Yang, D., J. Tao, L. Li, N. Kedei, Z. E. Toth, A. Czap, J. F. Velasquez, D. Mihova, A. M. Michalowski, S. H. Yuspa and P. M. Blumberg (2011). "RasGRP3, a Ras activator, contributes to signaling and the tumorigenic phenotype in human melanoma." *Oncogene* **30**(45): 4590-4600.
- Yang, M. H., G. Laurent, A. S. Bause, R. Spang, N. German, M. C. Haigis and K. M. Haigis (2013). "HDAC6 and SIRT2 regulate the acetylation state and oncogenic activity of mutant K-RAS." *Mol Cancer Res* **11**(9): 1072-1077.
- Yang, M. H., S. Nickerson, E. T. Kim, C. Liot, G. Laurent, R. Spang, M. R. Philips, Y. Shan, D. E. Shaw, D. Bar-Sagi, M. C. Haigis and K. M. Haigis (2012). Regulation of RAS oncogenicity by acetylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **109**: 10843-10848.
- Yeh, E., M. Cunningham, H. Arnold, D. Chasse, T. Monteith, G. Ivaldi, W. C. Hahn, P. T. Stukenberg, S. Shenolikar, T. Uchida, C. M. Counter, J. R. Nevins, A. R. Means and R. Sears (2004). "A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells." *Nat Cell Biol* **6**(4): 308-318.
- Yuan, T. L. and L. C. Cantley (2008). "PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme." *Oncogene* **27**(41): 5497-5510.
- Zarrinpar, A., R. P. Bhattacharyya and W. A. Lim (2003). "The structure and function of proline recognition domains." *Sci STKE* **2003**(179): RE8.
- Zhang, X., N. A. Spiegelman, O. D. Nelson, H. Jing and H. Lin (2017). "SIRT6 regulates Ras-related protein R-Ras2 by lysine defatty-acylation." *Elife* **6**.
- Zhang, X. F., J. Settleman, J. M. Kyriakis, E. Takeuchi-Suzuki, S. J. Elledge, M. S. Marshall, J. T. Bruder, U. R. Rapp and J. Avruch (1993). "Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1." *Nature* **364**(6435): 308-313.

- Zhou, X. Z., O. Kops, A. Werner, P. J. Lu, M. Shen, G. Stoller, G. Kullertz, M. Stark, G. Fischer and K. P. Lu (2000). "Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins." *Mol Cell* **6**(4): 873-883.
- Zhou, X. Z. and K. P. Lu (2016). "The isomerase PIN1 controls numerous cancer-driving pathways and is a unique drug target." *Nat Rev Cancer* **16**(7): 463-478.
- Zhou, Y. and J. F. Hancock (2015). "Ras nanoclusters: Versatile lipid-based signaling platforms." *Biochim Biophys Acta* **1853**(4): 841-849.
- Zondlo, N. J. (2013). "Aromatic-proline interactions: electronically tunable CH/pi interactions." *Acc Chem Res* **46**(4): 1039-1049.



## Anexo I: Lista de oligos

Nombre	Tipo	Proteína	Secuencia 5'	Secuencia 3'
<b>Bal 598/Bal 599</b>	mutación D59A	RRas2 humano	gcagtgtgtgatag atgccagagcagcc cggc	gccggggctcctctgg catctatcacacact gc
<b>Bal 600/Bal 601</b>	mutación R60A	RRas2 humano	cagtgtgtgatagat gacgcagcagcccg gc	gccgggctgtctccgt catctatcactcactg c
<b>Bal 610/Bal 611</b>	mutación E180A	RRas2 humano	ccgggttatcagga aatccaagcgcag gaatgtcctcc	ggaggacattcctgc gcttgaaattcctga taaccgg
<b>Bal 612/Bal 613</b>	mutación P184A	RRas2 humano	ggaaattcaagag caggaatgtgtcct tcaccagaacc	ggttctggtgaagga gcacattcctgtctt gaagttcc
<b>Bal 614/Bal 615</b>	mutación P187A	RRas2 humano	aggaatgtcctcct cagcagaaccaac acgg	ccgtgttggttctgct gaaggcggacattc ct
<b>Bal 681/Bal 682</b>	mutación F178A	RRas2 humano	gtccgggttatcag gaaagctcaagagc aggaatgtcc	ggacattcctgtctt gtgcttcctgataac ccggac
<b>Bal 683/Bal 684</b>	mutación Q179A	RRas2 humano	gtccgggttatcag gaaatttcagagc aggaatgtcc	ggacattcctgtctt gcaaatttcctgata accggac
<b>Bal 685/Bal 686</b>	mutación Q181A	RRas2 humano	caggaaattcaag aggcgggaatgtcct ccttcacc	ggtgaaggaggaca ttccgcctcttgaaat ttctg
<b>Bal 689/Bal 690</b>	mutación C183A	RRas2 humano	ggaaattcaagag caggaagctcctcc ttcaccagaacc	ggttctggtgaagga ggagcttcctgtctt gaaattcc
<b>Bal 691/Bal 692</b>	mutación P185A	RRas2 humano	caagagcaggaat gtcctgcttcaccag aaccaacacgg	ccgtgttggttctggt gaagcacattcctga tcttg

<b>Bal 693/Bal 694</b>	mutación S186A	RRas2 humano	caagagcaggaat gtcctcctgcaccag aaccaacacgg	ccgtgttggttctggt gcaggaggacattc ctgctcttg
<b>Bal 695/Bal 696</b>	mutación E188A	RRas2 humano	gaatgtcctccttca ccagcaccaacacg caaag	ctttccgtgttggtgg tggtgaaggagattc
<b>Bal 697/Bal 698</b>	mutación P189A	RRas2 humano	cctccttcaccagaa gcaacacggaaag aaaaagac	gtcttttctttccgtg ttgcttctggtgaag gagg
<b>Bal 713/Bal 714</b>	clonaje biosensor FRET	P110δ RBD humano	caggctagcatgcg tgtcagcaaccgag ccctg	cagaccggtccgga ggaggagtggacca tggt
<b>Bal 749/Bal 750</b>	mutación S186E	Rras2 humano	gagcaggaatgtcc tcctgaaccagaac caacacgg	ccgtgttggttctggt tcaggaggacattcc tgctc
<b>Bal 819/Bal 820</b>	Para sacar RBD de Raf-1 (aa 1-149). Biosensor FRET	Raf-1 RBD humano	gctagcatggagca catacaggagctt cg	accggtggcaagctt cahgaacgtcttccg
<b>Bal 821/Bal 822</b>	Para clonar CDS de RRas2 en Biosensor FRET	RRas2 humano	ctcgagatggccgc ggccggctgg	ggtaccctagaaaat gacacaatggcagc c
<b>Bal 914/Bal 915</b>	Para clonar el CDS de HRas en biosensor FRET	HRas humano	ctcgagatgacgga atataagctggtg	ggtacctcaggaga gcacacactt
<b>Bal 925/Bal 926</b>	Para clonar KRas (4B) en pEGFPC1	KRas (4B) humano	agatctatgactga atataaactt	ggatccttacataatt acac

<b>Bal 1078/Bal 1079</b>	Para clonar RRas2 (WT/ONCO/DN ) en vector pET28b	RRas2 humano	catatgatggccgc ggccggc	ggatccctagaaaat gacacaatggcagc c
<b>Bal 1610/Bal 1623</b>	Para clonar HRas WT en vector pET28b	HRas humano	ggatccctacctctc gtgtgtgaacg	catatgatgactgaa tataaacttgtggta g